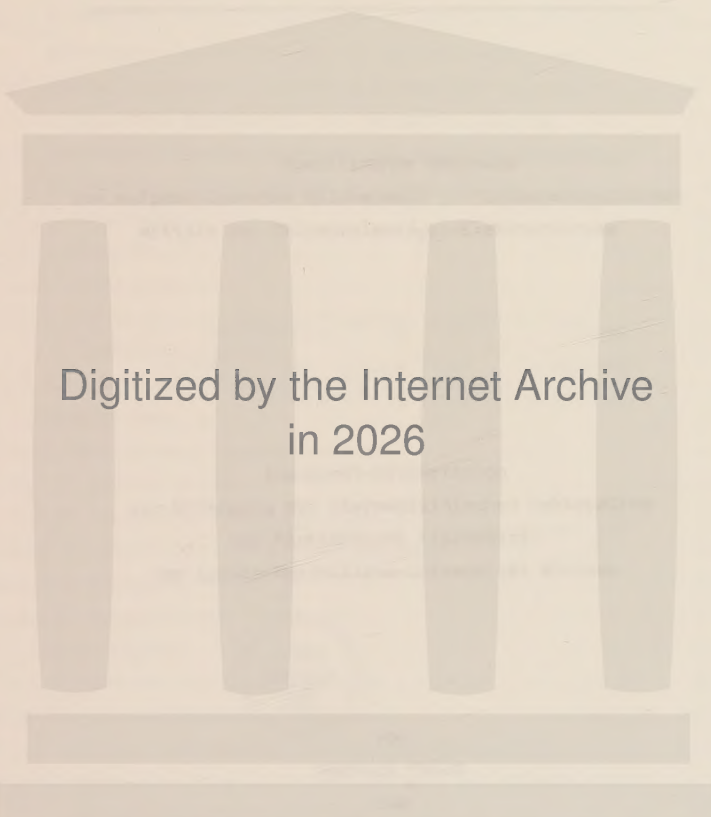


**Spezifischer Nachweis von
aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen
mittels der Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Hartmut Feist

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
Vorstände: Professor Dr. Dr. h.c. L. Kotter
Professor Dr. G. Terplan

Spezifischer Nachweis
von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen
mittels der Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München



von
Hartmut Feist
aus
Elsendorf

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. L. Kotter
Korreferent: Prof. Dr. H. Zucker

Tag der Promotion: 18. Juli 1976



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. LITERATUR	2
1. Aufgeschlossenes Milcheiweiß	2
1.1. Gesetzliche Bestimmungen für die Verarbeitung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen	2
1.2. Technologische und diätetische Bedeutung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen	3
1.3. Physikalische und chemische Eigenschaften von aufgeschlossenem Milcheiweiß	5
1.3.1. Zusammensetzung	5
1.3.2. Löslichkeit	7
1.3.3. Denaturierung	9
1.3.4. Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß aus Fleischerzeugnissen	11
1.4. Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen	14
1.4.1. Serologische Nachweismethoden	14
1.4.1.1. Präzipitation	15
1.4.1.2. Indirekte Hämagglutination	17
1.4.2. Nichtserologische Nachweismethoden	18
1.4.2.1. Chemische Verfahren	18
1.4.2.2. Physikalische Verfahren	19
2. Elektrophorese	20
2.1. Allgemeines zur Elektrophorese	20
2.2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese	21
2.2.1. Bildung und Struktur des Polyacrylamid-Gels	21
2.2.2. Kontinuierliche und diskontinuierliche (Disk-) Polyacrylamidgel-Elektrophorese	22
2.2.3. Molekularsieb- und Konzentrationseffekt	23
2.2.4. Vorgänge bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese	24
2.3. Der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese	25

	Seite
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
1. Vorversuche	27
1.1. Gelsystem	27
1.2. Auftragen der Proben	28
1.3. Stromstärke und Spannung	28
1.4. Färbung und Entfärbung	29
2. Hauptversuche	29
2.1. Material	29
2.1.1. Aufgeschlossene Milcheiweiß-Präparate und Vergleichs- substanzen	29
2.1.2. Wurstzusatzmittel	31
2.1.3. Modellchargen mit bekanntem aufgeschlossenem Milcheiweiß- Zusatz	31
2.1.4. Fleischerzeugnisse aus dem Handel mit deklariertem auf- geschlossenem Milcheiweiß-Zusatz	32
2.2. Methode	33
2.2.1. Vorbereitung der Proben	33
2.2.1.1. Auflösung der Reinsubstanzen	33
2.2.1.2. Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß aus Fleisch- erzeugnissen	33
2.2.2. Durchführung der Elektrophorese	33
2.2.3. Auswertung	35
2.2.3.1. Färbung und Entfärbung	35
2.2.3.2. Densitometrie	35
2.2.4. Verwendete Reagenzien	36
2.3. Ergebnisse	38
2.3.1. Vergleich der aufgeschlossenen Milcheiweiß-Präparate mit Casein	38
2.3.2. Identifizierung der Banden des Caseins	42
2.3.3. Vergleich anderer Wurstzusatzmittel mit Casein bzw. auf- geschlossenem Milcheiweiß-Präparaten	45
2.3.4. Vergleich zwischen Trockenblutplasma, Sojaeiweiß und Weizenkleber, jeweils in Kombination mit aufgeschlossenem Milcheiweiß	46
2.3.5. Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Modellchargen	48

	Seite
2.3.6. Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleisch- erzeugnissen aus dem Handel	50
2.3.7. Versuch des quantitativen Nachweises von aufgeschlossenem Milcheiweiß	53
2.3.8. Beeinflussung des aufgeschlossenen Milcheiweiß-Nachweises in Fleischwaren durch Erhitzung	56
2.3.9. Beeinflussung des aufgeschlossenen Milcheiweiß-Nachweises in Fleischerzeugnissen durch andere Fremdeiweiß-Zusätze	57
2.3.10. Untersuchung von lyophilisiertem Wurstgut ohne vorherige Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß	58
D. DISKUSSION	59
E. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	66
F. LITERATURVERZEICHNIS	70

A. EINLEITUNG

Zu den wertbestimmenden Faktoren eines Fleischerzeugnisses rechnet der Konsument neben einem entsprechenden Genußwert vor allem den Fleischanteil. Die Ermittlung des Muskelleiweißanteils erfolgt bisher indirekt, indem von den Stickstoffverbindungen - sofern festgestellt - Bindegewebsleiße, Fremdeiße und fremde NichtleißeStickstoffverbindungen abgezogen werden.

Zwischenzeitlich wurde am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Universität München - Fachbereich Tiermedizin - zwar eine Methode zur direkten Bestimmung des bindegewebsleiße-freien Muskelleiße entwickelt, solange aber diese Methode nicht Eingang gefunden hat in die Routine der Lebensmittelüberwachung, kommt dem Nachweis von Fremdeiße in Fleischerzeugnissen noch besondere Bedeutung zu.

Nachdem mit den bisher bekannten chemischen Verfahren der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiße nur ungenügend geführt werden kann und auch die in den letzten Jahren entwickelten serologischen Untersuchungsmethoden mit gewissen Unsicherheiten behaftet sind, wurde mir die Aufgabe gestellt, zu prüfen, inwieweit aufgeschlossenes Milcheiße unter Verwendung eines Polyacrylamidgels als Trägersubstanz elektrophoretisch nachgewiesen werden kann.

B. LITERATUR

1. Aufgeschlossenes Milcheiweiß

1.1. Gesetzliche Bestimmungen für die Verarbeitung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen

Die derzeit gültige Fleisch-Verordnung regelt die Zulassung von Fremdeiweißen in Fleischerzeugnissen (15). In Anlage 1 der Verordnung ist festgesetzt, welche Anforderungen aufgeschlossenes Milcheiweiß (aME) hinsichtlich Zusammensetzung und Reinheit erfüllen muß: Danach wird aME "ausschließlich aus pasteurisierter Milch durch Aufschluß mit Natrium-, Kalium- oder Calciumverbindungen der Kohlensäure oder Zitronensäure hergestellt". Der Milchzuckergehalt darf 0,5, der Aschegehalt (550°C) 5 und der Wassergehalt (105°C) 6% nicht übersteigen. Petrolätherlösliche Substanzen (bestimmt nach der Methode Weibull-Stoldt) dürfen in einer Konzentration von höchstens 2% vorhanden sein. Alkalische Bestandteile sowie Verbindungen der Kohlensäure dürfen nicht nachweisbar sein. Der pH-Wert (in 5%iger Lösung) darf nicht über 7 liegen und der Gehalt an wasserunlöslichen Bestandteilen darf 5% nicht überschreiten. aME muß in der Trockenmasse mindestens 87% Eiweiß enthalten (berechnet nach der Formel Stickstoff-Gehalt $\times 6,37$). Die Höchstgrenzen für den Bleigehalt werden auf 2 mg/kg, für den Eisengehalt auf 20 mg/kg und für den Kupfergehalt auf 5 mg/kg festgelegt.

Nach Anlage 3 zu § 4 der Fleisch-Verordnung (15) darf aME unter Kennzeichnung mit dem Hinweis "mit Milcheiweiß" bei folgenden Produkten verwendet werden: Fleischerzeugnisse, die aus fein zerkleinertem Fleisch hergestellt werden (§ 1 Abs. 1 Nr. 5), wie Brühwürste einschließlich Tafelfertigem Frühstücksfleisch, Pasteten und Rouladen nach Art der Brühwurst, Galantinen, Leberwurst, Leberpasteten, Leberparfaits, Leberpasten, Lebercremes, Wild- und Geflügelpasteten, tafelfertig zubereitete Fleischerzeugnisse wie Gulasch, Fleischrouladen, Fleischklopse, Füllungen aus zerkleinertem Fleisch, Frikassee, Ragout fin, Schmalzfleisch.

In den aufgeführten Erzeugnissen darf aME in einer Konzentration von höchstens 2% (bezogen auf die verwendete Fleisch- und Fettmenge) nur dann verwendet werden, wenn die Fleischwaren durch Erhitzen auf eine Kerntemperatur von mindestens 80°C in luftdicht verschlossenen Packungen oder Behältnissen haltbar gemacht werden.

Von der Kennzeichnungspflicht ist lediglich der erlaubte Zusatz von höchstens 2% aME (bezogen auf die verwendete Fleisch- und Fettmenge) zu Brät für die Herstellung von Fleischsalatgrundlage ausgenommen.

Anlage 3 zu § 4 (1) verbietet die kombinierte Verwendung folgender Zusatzstoffe: aME, Trockenblutplasma, flüssiges Blutplasma, flüssiges und gefrorenes Eiklar, Milch einschließlich entrahmter oder teilentrahmter Milch sowie Sahne- und Kondensmilcherzeugnisse.

1.2. Technologische und diätetische Bedeutung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen

Gemäß der Bindemittel-VO vom 14.1.1937 war ein Zusatz von 2% aME (in § 1 dieser VO als "quellfähiges Bindemittel" definiert), aber auch ein Zusatz von maximal 2% Magermilchpulver zur Wurstrohmasse von Fleisch-erzeugnissen, die zum alsbaldigen Verzehr bestimmt waren, ohne Kenntlichmachung erlaubt (75). Nach LERCHE (61) erfolgte der Zusatz von aufgeschlossenem Milcheiweiß, in der Literatur auch als "Nährcasein" bezeichnet (75), aus volkswirtschaftlichen Gründen. Das große Quellvermögen von aME führte zur Fertigung "wassertriefender Brühwürste" mit schwammiger Konsistenz. Eine Qualitätsverbesserung war damit in keiner Weise verbunden.

Das lösliche Milcheiweiß bildet mit dem durch das Salzen austretenden Fleischsaft eine konzentrierte Eiweißlösung aus hitzeoagulierbarem Muskeleiweiß und hitzebeständigem Milcheiweiß. Bei der weiteren Zerkleinerung emulgiert unter Zugabe von Eis diese Eiweißlösung das im Brät enthaltene Fett so, daß jedes Fetteilchen von einer Eiweißhülle (Haptogenmembran) umgeben wird. Ein "Zusammenfließen" wird verhindert und bei der nachfolgenden Hitzebehandlung entsteht ein geschlossenes, wabenartiges Gerüst (76). In Wirklichkeit dürfte dieser Effekt ein reiner Muskeleiweißeffekt sein.

HOLPERT (41) konnte mit Hilfe fluoreszierender Antikörper in histologischen Präparaten beobachten, daß Milcheiweiß zwar auch im denaturierten Muskel-
§ Gel fein verteilt vorlag, aber besonders konzentriert an den Vakuolen-
rändern nachgewiesen werden konnte. Die Verteilung des Milcheiweißes im Brät wurde durch unterschiedliche Verarbeitung des Milcheiweißes (Zugabe trocken oder voremulgiert zu Fleisch oder Fett) nicht verändert.

Nach KOTTER und PRÄNDL (55) erfährt das bei der Brühwurstherstellung in Lösung gebrachte Muskeleiweiß eine zusammenhängende Hitzeoagulierung, die zur Bildung eines schnittfesten Fertigfabrikates führt. Diese zusammenhängende Koagulation ist aber nur möglich, wenn viele fein verteilte Muskeleiweißkörper vorliegen. So kann sich dann ein Teil an den Grenzflächen zum Fett anreichern und als Emulgator und Stabilisator die Fettverteilung begünstigen und ein weiterer Teil zu den die Fettkügelchen umgebenden Eiweißfilmen und den grobdispersen Fleischteilchen Verbindung aufnehmen. Bei der Hitzedenaturierung entsteht somit ein festes Gerüst, das nicht nur die Fettpartikel, sondern auch feinste Kapillarräume so eng umschließt, daß das bei der Hitzeoagulation freiwerdende Wasser Aufnahme findet.

Muskeleiweiß ist bei Temperaturbelastungen über 75°C allein nicht in der Lage, Wasser und Fett ausreichend zu fixieren. aME kann bei der Bindung von Wasser und Fett teilweise an die Stelle von Muskeleiweiß treten, das dann in größerem Umfang für die Strukturbildung zur Verfügung steht. aME soll deshalb bei der Brühwurstherstellung nicht auf das Fleisch, sondern vor dem Vermischen mit dem Fleisch auf den Speck gegeben werden, damit möglichst viel Muskeleiweiß von der Aufgabe, Fett zu emulgieren, freigesetzt werden kann und zur Strukturbildung zur Verfügung steht (57).

aME allein ist zu keiner zusammenhängenden Koagulation befähigt und kann also allein auch nicht strukturverbessernd wirken (53).

BRENDL und KLEIN (8) weisen, neben dem positiven Einfluß von Milcheiweißpräparaten auf die Emulgierfähigkeit und das Wasserbindungsvermögen, auch auf eine angebliche Verbesserung des Nährwertes hin, die durch einen höheren Eiweißanteil bedingt sein soll.

Darüber hinaus ermöglicht der Zusatz von aME die Herstellung strukturverbesserter Erzeugnisse, die durch leichtere Verdaulichkeit der emulgierten Fette beachtliche diätetische Vorteile für den Verbraucher bieten (16, 27, 45, 56).

Auch NÜSE (68) sieht in der Verwendung von aME als Emulgator einen diätetischen Vorteil für den Verbraucher, da "die in emulgierter Form in den Erzeugnissen enthaltenen Fette besser verdaulich und für fettempfindliche Personen besser verträglich sind".

Nach PFAFF (76) sind für gewisse Verbraucher durch die Verwendung von Kaliumcaseinaten und Calciumcaseinaten diätetische Vorteile entstanden. Die Verwendung von Kaliumcaseinat ermöglicht die Herstellung neutral-schmeckender, kochsalzarmer Wursterzeugnisse. Das leicht verdauliche Calciumcaseinat ist zur Calciumanreicherung in Fleischwaren geeignet, die z.B. für Kranke, Kinder und alte Menschen bestimmt sind.

1.3. Physikalische und chemische Eigenschaften von aufgeschlossenem Milcheiweiß

1.3.1. Zusammensetzung

Das in der Kuhmilch enthaltene Eiweiß besteht zu 80% aus Casein und zu 20% aus Molkeneiweiß (81). Durch die gesetzlich vorgeschriebene Herstellung bedingt, besteht aME praktisch nur aus Casein. Im Casein sind Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel und Phosphor enthalten. Der Phosphor liegt als Phosphorsäure vor und ist durch esterartige Bindungen an die Aminosäuren des Caseins geknüpft. Casein ist also ein Phosphoprotein, sein Molekulargewicht beträgt etwa 30.000. Da die im Casein enthaltenen Aminosäuren sowohl freie Amino- wie Säuregruppen enthalten, ist Casein ein amphoterer Elektrolyt, der als Säure wie auch als Base dissoziieren kann. Die saure Reaktion des Caseins ist darauf zurückzuführen, daß es mehr Carboxyl- als Aminogruppen enthält (5).

Nach BELITZ und SCHORMÜLLER (4) muß ein einheitliches Protein folgende Kriterien erfüllen: Einheitliches Verhalten beim Ultrazentrifugieren, bei der Elektrophorese unter variierenden Bedingungen (pH-Wert und Ionenstärke) und bei chromatographischen Verfahren. Bei biologisch aktiven Proteinen darf sich die spezifische Aktivität nicht ändern.

Daß das säuregefällte Casein o.a. Bedingungen nicht erfüllt, hat MELLANDER (65) bereits 1939 bewiesen. Er trennte Casein in der Elektrophorese in 3 Komponenten auf, die er der fallenden Reihenfolge ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit nach als α -, β - und γ -Casein bezeichnete. SCHULTE und MÜLLER (87) konnten ebenso wie HIPP und Mitarb. (38) 3 Fraktionen des Caseins elektrophoretisch nachweisen. WARNER (101) gelang die Trennung von α - und β -Casein; HIPP und Mitarb. (37) die Abtrennung von γ -Casein aufgrund seiner Löslichkeit in 50%igem Alkohol.

Nach HIPP und Mitarb. (38) besteht das unfractionierte Casein, bezogen auf Gesamtcasein, zu 75% aus α -Casein, 22% aus β -Casein und 3% aus γ -Casein. BRUNNER und Mitarb. (9) sowie THOMPSON und Mitarb. (98) fanden folgendes Verhältnis: Gesamtcasein 76 - 86%, davon 45 - 63% α -Casein, 19 - 28% β -Casein und 3 - 7% γ -Casein.

Die α -Caseinfraktion besitzt neben der höchsten Ionenbeweglichkeit auch den höchsten Phosphorgehalt (0,99%), während die β -Caseinfraktion geringere Ionenbeweglichkeit und geringeren Phosphorgehalt (0,6%) aufweist; γ -Casein enthält 0,05% Phosphor (5, 43). Nachdem γ -Casein mit nur 5% am Gesamtgemisch des Caseins beteiligt ist und in verstärktem Maße in pathologischer Milch, z.B. Mastitismilch, auftritt, bezweifeln KIERMEIER und KIRCHMEIER (48), ob es sich dabei tatsächlich um eine Komponente des Caseins handelt. WAUGH und VON HIPPEL (102) haben als erste nachgewiesen, daß α -Casein aufgrund der unterschiedlichen Dissoziation und Löslichkeit in Anwesenheit von Ca-Ionen in eine calciumempfindliche (α_s -Casein) und eine calciumstabile (α_x -Casein) Fraktion aufzutrennen ist. Nach HIPP und Mitarb. (38) hat α_x -Casein unter anderem die Aufgabe, die α -Caseinfraktion gegenüber Calcium zu stabilisieren. Bis heute werden in der Literatur

(Tabelle 1) aufgrund verschiedener chemischer und physikalischer Eigenschaften sowie unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung im Milcheiweiß mehr als 30 Phänotypen und Varianten beschrieben (81).

Tabelle 1: Zusammensetzung des Caseins (81)

Casein- fraktion	Varianten	Anteil am Milcheiweiß		Anteil am Casein	
		Mittelwert in %	Schwankungs- breite in %	Mittelwert in %	Schwankungs- breite in %
α_s	A,B,C,D	44,2	35 - 63	54,8	49 - 60
κ	A,B	10,7	8 - 15	13,2	7 - 28
β	A,B,C	24,1	19 - 35	29,6	26 - 35
γ	A,B	2,0	1 - 3	2,4	2 - 6

Trotz zahlreicher Versuche, das Casein weiter zu fraktionieren, bestehen nach BRUNNER und Mitarb. (9) doch erhebliche Schwierigkeiten. Die Autoren berichten: "Obwohl die elektrophoretische Trennung der Eiweißkomponenten in der Zonenelektrophorese als bequeme Klassifizierungsmethode ausgewählt wurde, hat man doch die Möglichkeit erkannt, daß viele dieser sogenannten einheitlichen Proteine eigentlich Komplexe oder heterogene Gemische von Proteinen sind, die bei pH 8,6 ähnliche elektrophoretische Eigenschaften besitzen."

1.3.2. Löslichkeit

Grundsätzlich beruht die Löslichkeit eines Stoffes auf der Wechselwirkung zwischen seinen dissozzierenden Gruppen und dem pH-Wert des Lösungsmittels. Sie entspricht der Potentialdifferenz des Stoffes zum Lösungsmittel (13).

Eiweißkörper sind nur in polaren Lösungsmitteln (vor allem in Wasser), in wenig polaren Lösungsmitteln (wie Äther) dagegen nicht löslich. Für den Grad der Löslichkeit sind einerseits die zwischen den einzelnen Eiweiß-

molekülen wirksamen Kräfte, sogenannte Gitterkräfte, und andererseits die zwischen den Eiweißmolekülen und den Molekülen des Lösungsmittels wirkenden Kräfte entscheidend. Je fester die Gitterkräfte sind, die den Eiweißkörper im festen Zustand zusammenhalten, desto größer muß die Affinität zum Lösungsmittel sein. Alle polaren Gruppen der Proteine können mit polaren Lösungsmitteln, insbesondere mit Wassermolekülen, in Wechselwirkung treten (5).

Die Wasserlöslichkeit von Proteinen variiert stark, manche Proteine lösen sich leicht in reinem Wasser, andere in einer bestimmten Konzentration an Salzen, andere lösen sich in Äthanol, während wieder andere sich in milden wäßrigen Lösungsmitteln überhaupt nicht lösen (43).

Ein Minimum an Löslichkeit zeigen die Proteine am isoelektrischen Punkt (I.P.). Nach JENNESS und PATTON (43) ist hier die wechselseitige Anziehung der positiven und negativen Ladungen der benachbarten Moleküle am größten. Da der Eiweißkörper am I.P. elektrisch neutral erscheint, ist keine Wechselwirkung mit den Molekülen des Lösungsmittels möglich. In Abhängigkeit zur Entfernung des pH-Wertes des Lösungsmittels vom I.P. entwickelt sich ein Nettoüberschuß an positiven oder negativen Ladungen. Durch Anziehung von Wasser wird das Protein nun gelöst. In ähnlicher Weise wird durch geringe Zugabe von Neutralsalzen die Ladung der Proteine verändert. Diese Erscheinung wird als "Einsalz-Effekt" (salting in) bezeichnet. Neutralsalze in höherer Konzentration setzen die Löslichkeit herab. Aufgrund der Hydratationsneigung anorganischer Ionen wird durch Wasserentzug das Protein aus der Lösung herausgedrängt ("Aussalz-Effekt" - salting out) (43).

Alle Phosphoproteide lösen sich leicht in Alkalien und können durch Zugabe von Säuren wieder ausgefällt werden. Als amphotere Stoffe sind sie in stärkeren Säuren schwer, in reinem Wasser unlöslich. Durch Ammoniumsulfat, das sich am besten zum "Aussalzen" eignet, wird Casein bis zu 26% seiner Gesamtmenge gefällt (5).

Die Löslichkeit von α - und β -Casein hängt in erster Linie vom pH-Wert und nur in geringem Maße von der Salzkonzentration des Lösungsmittels ab. Mit zunehmender Entfernung des pH-Wertes vom I.P. lösen sich α - und β -Casein sehr leicht. Aufgrund des unterschiedlichen Lösungsverhaltens kann α -Casein von β -Casein leicht getrennt werden. α -Casein fällt bereits bei pH 4,2 (= I.P.) und 2°C, β -Casein dagegen erst bei pH 4,9 (= I.P.) und 20°C aus. γ -Casein löst sich gut in 50%igem Äthanol (43).

1.3.3. Denaturierung

KARLSON (46) definiert die Denaturierung der Proteine als Strukturänderung, bei der die biologischen Eigenschaften (z.B. Enzym- oder Hormonwirkung) verloren gehen. Die Löslichkeit wird stark verringert und chemische und physikalische Eigenschaften werden verändert. Meist ist die Denaturierung irreversibel oder nur unter bestimmten Bedingungen reversibel.

Es können durch physikalische (Hitze, Beschallung, Oberflächenkräfte, Druck, UV-Bestrahlung oder Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen) oder chemische Behandlungen (mit Alkohol, Aceton, Lösungen von Harnstoff, Guanidin oder ionischen Reinigungsmitteln und durch starke Säuren und Basen) Proteine denaturiert werden (43).

Im allgemeinen geht die Denaturierung nicht mit einer Lösung kovalenter Bindungen einher. Die Veränderungen betreffen vielmehr die Sekundär- und Tertiärstruktur und die Zerstörung der komplizierten Faltungs- und Spiralanordnung der Moleküle (28). Nach HAURWITZ (28) kann somit die Denaturierung auch als Änderung der Konstellation bzw. Konformation definiert werden.

Die eigentlichen Peptidbindungen werden nach DITTMER (13) bei der Denaturierung nicht angegriffen, vielmehr sind Wasserstoff- und Schwefelbindungen sowie andere zwischenmolekulare Kräfte, die die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der Eiweiße darstellen, betroffen.

PUTNAM (78) dagegen betrachtet die Denaturierung weniger als chemischen Vorgang. Nach seiner Meinung ist die Denaturierung vielmehr eine irreversible physikalische intramolekulare Umordnung der nativen Proteinstruktur. Die Veränderung der spezifischen räumlichen Struktur finde statt ohne Hydrolyse von kovalenten Bindungen.

Allgemeines Kennzeichen der Denaturierung ist die Aggregation bzw. Koagulation (5, 43, 99).

Die Phosphoproteide neigen nach BLIX und Mitarb. (5) kaum zur Denaturierung. ROULET und Mitarb. (83) bezeichnen die Caseine sogar als "undenaaturierbar" oder zumindest sehr hitzestabil. JENNESS und PATTON (43) berichten, daß Casein durch Hitzebehandlung (60 - 100°C bis zu 5 Stunden), die alle anderen Proteine denaturieren würde, nicht verändert wird.

Nach DEGENKOLB und HINGERLE (11) soll aME in Brühwürsten auch durch die Sterilisationstemperatur von 117°C nicht zur Koagulation zu bringen sein.

SINELL (89) konnte in Extrakten aus caseinhaltigen Fleischerzeugnissen, die auf 125°C erhitzt worden waren, serologisch mittels Präzipitation praktisch kein Casein mehr nachweisen. Durch diese Temperatur seien Casein und seine Abbaustufen im Zustand weitgehend irreversibler Denaturierung.

Nach LARSON und ROLLERI (60) lösen hitzebedingte Veränderungen am Casein einen anderen Mechanismus aus als z.B. bei Serumproteinen. Unter Einwirkung höherer Temperaturen, als zur Denaturierung von Serumproteinen notwendig, kommt es zunächst zur Erhöhung der Viskosität und erst bei stärkerer Hitzeeinwirkung unter Trennung des Systems (Aggregation und Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes) zu einer tatsächlichen Koagulation des Caseinates.

Die Stabilität der Caseinpartikel wird nicht nur von Hitze beeinflusst, sondern auch von Faktoren wie pH-Wert, Salze und Serumproteine, mit denen sie Komplexe unter Hitzeeinwirkung bilden können. Nach JENNES und PATTON

(43) sind Veränderungen, die am Casein durch Hitzeeinwirkung hervorgerufen werden, mit der allgemein gültigen Definition der Denaturierung nicht zu vergleichen. Man sollte daher diesen Ausdruck im Hinblick auf Casein vermeiden.

1.3.4. Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß aus Fleischerzeugnissen

Nach JÜBERMANN (44) ist unter "Extraktion" oder "Extrahieren" allgemein ein Verfahren zu verstehen, das geeignet ist, eine Substanz oder Substanzgruppe aus einem Gemisch oder einer Lösung durch ein selektiv wirkendes Lösungsmittel "herauszuholen". Es findet also ein Stoffaustausch zwischen den beiden Lösungsmitteln statt.

Zur Extraktion von Fremdeiweißen aus Fleischerzeugnissen werden zwar unterschiedliche Verfahren vorgeschlagen, sie unterscheiden sich jedoch nur in Einzelheiten: In der Art des Lösungsmittels und seines pH-Wertes, in der Extraktionsmittel- und Probenmenge, der Extraktionsdauer und -temperatur sowie der Vorbehandlung des Untersuchungsgutes (Zerkleinerung, Lyophilisation).

DEGENKOLB und HINGERLE (12) bestimmen vor der Extraktion Wasser- und Fettgehalt der Probe. Die erforderliche Menge Extraktionsmittel errechnen sie dann nach der Formel: $4(4a + 1b) - 10 = \text{ml Extraktionsmittel}/10 \text{ g Untersuchungsmaterial}$. Dabei ist a die fettfreie Trockensubstanz in g und b der Fettgehalt in g. Dadurch soll die Fremdeiweißbestimmung auf die Fleischverordnung abgestellt werden, die den Zusatz von Fremdeiweiß auf die verwendete Fleisch- und Fettmenge bezieht. Um stärker eingeeengte Extrakte zu erhalten, schlagen GERICK und KRÜGER (20) vor, die Extraktionsmittelmenge nach der Formel $(4a + 1b) \times 2 = \text{ml Extraktionsmittel}/10 \text{ g Untersuchungsmaterial}$ zu berechnen.

Für HERRMANN (30) sowie KOTTER und Mitarb. (53) ist die Lyophilisation des Wurstgutes vor der Extraktion der Fremdeiweiße besonders bei hoch-erhitztem Untersuchungsmaterial die Methode der Wahl, da die Proteine

infolge Lyophilisation als schwammartiges Netz- oder Maschenwerk in feinsten Verteilung vorliegen und die so erreichte Vergrößerung der Oberfläche optimale Voraussetzungen für die Löslichkeit schafft. KLUGE-WILM (49), DEGENKOLB und HINGERLE (12) und GERIGK und KRÜGER (20) konnten jedoch nach Lyophilisation der Proben keine nennenswerte Verbesserung der Extraktion feststellen.

DEGENKOLB und HINGERLE (11, 12) zerkleinern 100 g Wurstgut bei 20°C im Fleischwolf mit einer 3 mm-Scheibe und versetzen es mit 5 (16e + 4b - 10) ml physiologischer Kochsalzlösung und 2,0 ml 1 n Natronlauge. Nach mehrmaligem Umrühren wird das Gemisch für 2 Stunden bei 50°C im Wasserbad gehalten und dann mit dem Ultra-Turrax 30 Sekunden mit 24.000 U/min homogenisiert, der pH-Wert durch Zugabe weiterer Natronlauge auf 7,5 eingestellt und nochmals 30 Sekunden lang homogenisiert. Das Homogenisat wird 10 Minuten bei 4.000 U/min zentrifugiert, der Extrakt abgesaugt und zur Untersuchung verwendet.

SINELL und KLUGE-WILM (90) verwenden von 100 g im Mixer zerkleinertem Untersuchungsmaterial 5 g, die sie mit 5 ml kochender physiologischer Kochsalzlösung versetzen, kräftig schütteln und anschließend 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen lassen. Dann wird 30 Minuten bei 5.000 U/min zentrifugiert und der Überstand abfiltriert.

GÜNTHER (24, 25) verreibt 5 g, bei inhomogenem Material bis 10 g des Probenmaterials im Mörser mit 7 bzw. bis 14 ml Barbitalspuffer mit einem pH-Wert von 8,3. Das Gemisch wird in ein 100 ml-Becherglas gegossen, mit 3 ml oder entsprechend der Einwäge mehr Puffer nachgespült und nach dem Vermischen 2 Stunden im Brutschrank bei 40°C stehen gelassen. Dann wird 10 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert, der Überstand filtriert und das Filtrat verwendet.

Die Standard-Extraktionsmethode, die vom ALTS (Arbeitskreis Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger) erarbeitet wurde, beschreiben GERIGK und KRÜGER (20): Aus dem Kern der Probe werden 20 g

entnommen und vorzerkleinert; davon werden 10 g lyophilisiert und anschließend zur Bestimmung des Wassergehaltes gewogen. Die gesamte gefriergetrocknete Probenmenge wird mit der 5fachen Gewichtsmenge Veronalpuffer versetzt. Dieses Gemisch wird mit dem Ultra-Turrax bei 20.000 U/min 30 Sekunden lang homogenisiert. Die Extraktion erfolgt mindestens 2 Stunden bei Zimmertemperatur. Anschließend wird bei 2.000 g/min 10 Minuten zentrifugiert, die Fettschicht durchstochen und der Extrakt abgesaugt.

KRAACK (58) lyophilisiert das zuvor mit dem Wolf (3 mm-Scheibe) zerkleinerte Wurstgut und verwendet davon einen Teil, den er mit fünf Teilen Veronalpuffer-Lösung (60°C) versetzt und anschließend mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Nach 2 Stunden Inkubation wird das Material auf 4°C abgekühlt und filtriert. Das Filtrat wird dann mit Hilfe der Immundiffusion untersucht.

VON PICKARDT (77) schlägt für die optimale Extraktion von aME aus erhitzten Fleischerzeugnissen folgende Methode vor: 30 g Untersuchungsmaterial aus dem Kern der Probe werden lyophilisiert. 2 g des Lyophilisates werden mit der viereinhalbfachen Menge physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,2) versetzt und im Ultra-Turrax 30 Sekunden homogenisiert und dann zentrifugiert. Der Überstand wird für den serologischen Nachweis verwendet.

Zum Nachweis von aME in der Harnstoff-Stärkegel-Elektrophorese extrahieren OLSMAN und Mitarb. (69) das zerkleinerte und mehrmals mit Aceton entfettete Probengut mit 8 m Harnstoff-Lösung.

Für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese macht SPELL (95) das Untersuchungsmaterial durch zweimalige Extraktion mit Aceton und Äther fettfrei und extrahiert davon 200 mg in 10 ml Tris-Borsäurepuffer (mit Zusatz von 6,6 m Harnstoff, pH 8,7) 1 Stunde bei 35 - 40°C auf dem Magnetrührer. Die Extrakte werden bei 2.000 U/min zentrifugiert und 10 µl vom Überstand in die Geltaschen einpipettiert.

Für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese extrahieren HOFMANN und PENNY (40) die Eiweiße mit SDS (Natrium-Dodecylsulfat). Die Extraktionsflüssigkeit setzt sich aus 10 ml 2%iger wäßriger SDS-Lösung, 10 ml Borsäure-Trispuffer (pH 8,2) und 10 mg DTT (Dithiothreitol) zusammen.

FREIMUTH und KRAUSE (19) führen die Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit Extrakten durch, die auf folgende Weise gewonnen werden: 5 g homogenes Untersuchungsmaterial werden zweimal mit Petroläther entfettet und in 10 ml Harnstoff-Borat-Puffer (pH 8,6) verbracht. Das Gemisch wird dann 15 Minuten bei 40°C gerührt, auf Zimmertemperatur abgekühlt und bei 6.000 g/min 15 Minuten lang zentrifugiert. Der milchig-trübe Überstand wird zur Elektrophorese verwendet.

VAN BAAL und LEGET (3) fällen aus dem zerkleinerten, getrockneten und entfetteten Untersuchungsmaterial durch zweimalige Trichloressigsäure- und einmalige Essigsäurezugabe das Casein und lösen es in Veronalpuffer (pH 8,6). Diese Lösung verwenden sie zur Papierelektrophorese.

DE HOOG und Mitarb. (42) extrahieren das zerkleinerte, entfettete Probenmaterial mit Aqua dest. und Natronlauge bei einem pH-Wert von 9,0 und einer Temperatur von 40°C. Nach Dekantieren des ersten Filtrates wird unter gleichen Bedingungen so lange gewaschen, bis das Filtrat völlig klar ist. Anschließend wird der gewonnene Extrakt mit Salzsäure auf pH 7,0 eingestellt und bei 60°C getrocknet. Der Nachweis von aME wird mittels der Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt.

1.4. Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen

1.4.1. Serologische Nachweismethoden

Alle zum Nachweis und zur Identifizierung von Eiweißen in "Gemischen" angewandten serologischen Verfahren basieren auf spezifischen Antigen-(AG)-Antikörper(AK)-Reaktionen. Die AG-AK-Reaktion läuft in zwei Phasen

ab. In der ersten Phase kommt es zur Bildung eines AG-AK-Komplexes, der dann durch Elektrolyte sichtbar gemacht wird (2. Phase). Die AG-AK-Reaktion kann in drei Erscheinungsformen ablaufen: Agglutination (Verklumpung), Präzipitation (Fällung) und Lysis (Auflösung) (33). Die für den Fremdeiweißnachweis in Fleischwaren gebräuchlichsten Methoden sind Präzipitation und Indirekte Hämagglutination (I.H.).

1.4.1.1. Präzipitation

Das Präzipitationsverfahren kann als α - oder β -Verfahren durchgeführt werden, wobei für den Fremdeiweißnachweis dem α -Verfahren (konstanter AK, variierendes AG) der Vorzug gegeben wird (89, 29).

UDIN (73) und OUCHTERLONY (71, 72) entwickelten ein Verfahren, bei dem AG und AK in einem halbfesten Medium (Agargel) aufeinander zu diffundieren. Bei positiver Reaktion bilden sich an der Berührungsstelle von homologem AG und AK scharf abgegrenzte Präzipitationsbanden. Bei dieser Methode, auf dem Objektträger ausgeführt, werden kleinste Mengen an AG und AK zur Reaktion benötigt.

Für den qualitativen Nachweis von Fremdeiweißen in Fleischerzeugnissen hat die Agar-Gel-Diffusion breite Anwendung gefunden (14, 32, 52, 103, 104).

Mittels der Agar-Gel-Diffusion (AGD) weisen WYLER und SIEGRIST (103, 104) aME und Sojaprotein in Extrakten aus Fleischerzeugnissen nach. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,1%, wobei die Autoren jedoch keine Angaben über den Erhitzungsgrad der Proben machen.

HERRMANN, HOLPERT und PFEIFFER (32) berichten über den Nachweis von aME mit Hilfe der AGD. Sie konnten in Brühwürsten die Konzentrationen 1,5%, 2,0%, 2,5% und 3,0% aME grobquantitativ unterscheiden. Bei Erhitzung des Untersuchungsgutes (30 Minuten auf 80 bis 85°C) konnten sie nur noch zwischen den Konzentrationen 1%, 2% und 3% differenzieren.

GÜNTHER (25) führt die Immundiffusion nicht nur im Agar-Gel, sondern auch auf einer mit Pufferlösung befeuchteten Cellulose-Acetat-Folie durch und kann aME auch noch nach Erhitzung des Probenmaterials auf 120°C nachweisen.

KRAACK (58) hat ein als Screening-Test vorgeschlagenes Verfahren (modifizierte Immundiffusion nach OUCHTERLONY) beschrieben, das schon nach zweistündiger Inkubation eine Auswertung zuläßt.

DEGENKOLB und HINGERLE (11) entwickelten auf der Basis der Präzipitation den "abgestuften Serotest". Durch Präzipitattmessung sind hierbei quantitative Aussagen möglich.

GRABAR und WILLIAMS (22) entwickelten die "Immunelektrophorese", eine Kombination von Immundiffusion und Elektrophorese. SCHEIDEGGER (85) modifizierte diese Methode zur Trennung bzw. Identifizierung von Eiweißen als Mikroverfahren. Das in der Agargel-Elektrophorese aufgetrennte Protein (Antigen) reagiert mit dem spezifischen Antiserum, das in eine senkrecht zur elektrophoretischen Wanderungsrichtung ausgestanzte Rinne eingefüllt wird. Nach ENOCH (14), HERRMANN und KOTTER (38) sowie HERRMANN, MERKLE und KOTTER (35) ist mittels der Immunelektrophorese bestenfalls eine semiquantitative Aussage über den Gehalt an Fremdeiweiß in erhitzten Fleischwaren möglich. KLUGE-WILM (49) konnte in Modellbrühwürsten mit Hilfe der Immunelektrophorese aME in Konzentrationen von 0,25% bis 4% grobquantitativ bestimmen, in hocherhitzten Fleischerzeugnissen jedoch nur qualitativ.

SINELL (89) hält eine annähernd quantitative Auswertung mit Hilfe der Immunelektrophorese für möglich, "wenn man ein Vergleichsmaterial zur Hand hat, das dem Untersuchungsmaterial hinsichtlich Herstellung und Zusammensetzung weitgehend entspricht". Ein Rückschluß von mitlaufenden aME-Lösungen bekannter Konzentrationen auf die Konzentration von aME in Fleischerzeugnissen müsse dagegen zu Fehlschlüssen führen.

Ab einer Konzentration von 0,25% ist in bis auf 120°C erhitzten Fleischwaren der Nachweis von aME mittels der Immunelektrophorese möglich (90).

Auf der Empfehlung von OUCHTERLONY (72) basierend, in die immunelektrophoretische Analyse eine Serie von Proben mit bekannter Konzentration einzubeziehen, beschrieben HANSON (26) und WADSWORTH und HANSON (100) die sogenannte "komparative Immunelektrophorese". Mittels dieser Methode soll bereits ein Trockenmilchzusatz von 0,1% zum Untersuchungsmaterial sichtbar gemacht werden können.

Eine andere Art der Sichtbarmachung der AG-Ak-Reaktion ist die Fluoreszenzmarkierung der Antikörper. HOLPERT (41) sowie HERRMANN und Mitarb. (32) haben mit dieser Methode aME in Fleischwaren qualitativ nachgewiesen.

1.4.1.2. Indirekte Hämagglutination

Im Gegensatz zur direkten Hämagglutination, bei der Erythrozyten durch direkte Einwirkung eines mikrobiellen Antigens verklumpt werden, reagieren bei der Indirekten Hämagglutination (I.H.) die Antikörper nicht mit einem Antigen, das primär den Erythrozyten zugeordnet ist, sondern mit einem Antigen, das vor der eigentlichen Reaktion schon adsorptiv an die Blutzellenoberfläche gebunden wurde, so daß die roten Blutkörperchen sozusagen als Indikator für die AG-Ak-Reaktion fungieren (86).

HERRMANN (31) erfaßt aME mit einer modifizierten I.H. in bis auf 115°C erhitztem Untersuchungsgut von 0,1% an quantitativ.

KLUGE-WILM (49), die die Immunelektrophorese mit der I.H. vergleicht, kann die Ergebnisse von HERRMANN (31) sowie KOTTER und Mitarb. (53), die die I.H. als eine besonders empfindliche, spezifische Methode zur quantitativen Bestimmung von Fremdeiweiß in Fleischwaren empfehlen, nicht bestätigen. Sie berichtet dagegen von guten Ergebnisse mit der Immunelektrophorese.

Im Bestreben, die I.H. weiter zu vereinfachen und sie Routine-Untersuchungen zugänglicher zu machen, haben HERRMANN und MERKLE (34, 36) die standardisierten sensibilisierten Hammelerythrozyten mit Formalin konserviert.

KRAACK (58) wendet ein Mikroliter-Mikrotiter-System für die I.H. an, das sich durch äußerst geringen Zeit- und Materialaufwand auszeichnet, was besonders im Hinblick auf den Serumverbrauch wichtig ist. Der Autor hält die Empfindlichkeit (unterste Grenze 1,0 mg aME/ml Pufferlösung) dieser Methode für die Routine für ausreichend.

SINELL und MENTZ (91) empfehlen besonders für Serienuntersuchungen zur Bestimmung von aME in Fleischerzeugnissen die Hämagglutinationshemmung als Mikrotiter-Methode wegen der Zeit- und Materialeinsparung. Unter Berücksichtigung einer genügend großen Anzahl von Parallelansätzen sei das Verfahren zur quantitativen Auswertung geeignet. Die Verfasser empfehlen Kontrolle der Spezifität mit der Gel-Diffusion.

1.4.2. Nichtserologische Nachweismethoden

1.4.2.1. Chemische Verfahren

Die heute für die quantitative chemische Bestimmung von aME in Fleischerzeugnissen bevorzugt verwendeten Methoden beruhen auf der Erfassung des an Milcheiweiß gebundenen Phosphors ("Phosphoprotein-Phosphor"). Zwei Verfahren finden breite Anwendung:

Das Verfahren von KUTSCHER, NAGEL und PFAFF (59) haben STADELMANN (96) und BRAUN (7) weiterentwickelt. Hierbei werden die Lipide einschließlich der Phospho-Lipide mit einer Alkohol-Äther-Mischung extrahiert und anschließend der organisch gebundene wasserlösliche Phosphoranteil durch Extraktion mit Trichloressigsäure entfernt. Der Phosphoprotein-Phosphor wird aus den Phosphoproteiden durch Inkubation mit Natronlauge abgespalten und anschließend quantitativ bestimmt. Aus diesem Phosphoprotein-Phosphor-Gehalt wird der Milcheiweißgehalt errechnet.

Die Arbeitsweise von THALACKER (97) beruht auf dem gleichen Prinzip, unterscheidet sich jedoch von der Methode nach KUTSCHER und Mitarb. (59) dadurch, daß bei der Extraktion der Lipide Alkohol und Alkohol-Chloroform verwendet wird anstelle von Alkohol-Äther. Zur Entfernung säurelöslicher Phosphorverbindungen und der Nukleinsäuren wird nicht Trichloressigsäure, sondern Perchlorsäure verwendet (97). Aufenspaltung der Phosphorsäuregruppen durch Einwirkung von Natronlauge auf das Phosphoprotein wird verzichtet. Das Phosphoprotein wird zusammen mit den Gewebeproteinen durch 60%ige Perchlorsäure verascht.

1.4.2.2. Physikalische Verfahren

VAN BAAL und LEGET (3) weisen Casein mittels der Papier-Elektrophorese in Veronalpuffer nach.

OLSMAN und Mitarb. (69) beschreiben den Nachweis von aME und Soja-Eiweiß mit Hilfe der Harnstoff-Stärkegel-Elektrophorese. In Wurstwaren, die bis auf 115°C erhitzt worden waren, konnten sie aME ab einem Zusatz von 0,25% nachweisen. Durch Vergleichsproben soll eine "grobquantitative Schätzung" möglich sein.

VAN GILS und HIDSKEs (21) benutzen Harnstoff für Extraktion und Elektrophorese und als Trägermaterial Celluloseacetat-Membranfilter. Sie weisen aME ab einer Konzentration von 0,1% im fertigen Erzeugnis nach.

DE HOOG und Mitarb. (42) weisen aME und Sojaprotein in erhitzten Fleischerzeugnissen mittels der Dichtegradienten-Zentrifugation nach.

ZWETOVKA (105) ermittelt aME in Fleischerzeugnissen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Sephadex.

MONTAG (66) extrahiert aME aus der fettfreien Trockenmasse des Untersuchungsmaterials im alkalischen Milieu. Durch Fällungen mit Ammoniumsulfat am I.P. läßt sich das Caseinat nahezu vollständig abtrennen.

Der Nachweis erfolgt spektralphotometrisch, wobei die Tryptophan-Tyrosin-Bande bei einer Wellenlänge von 225 nm in 6 m Harnstofflösung gemessen wird.

NORDAL und ROSSEBØ (67) machen sich beim Nachweis von aME in Fleischwaren die spezifisch proteolytische Wirkung bakterieller Enzyme auf Na-Caseinat zunutze. Die unterste Nachweisgrenze liegt zwischen 0,2 und 0,4% Caseinat.

2. Elektrophorese

2.1. Allgemeines zur Elektrophorese

MAURER (64) definiert die Elektrophorese allgemein: Ein elektrisch geladenes Teilchen wird in einem viskösen Medium (Flüssigkeit oder Gel) durch die Einwirkung eines elektrischen Feldes zur Wanderung veranlaßt. Die negativ geladenen Teilchen wandern dabei auf die Anode zu, die positiv geladenen auf die Kathode zu.

Die Teilchenbeweglichkeit ergibt sich aus dem Quotienten aus Geschwindigkeit und Feldstärke. Sie wird unter anderem vom pH-Wert und von der Ionenstärke des Mediums beeinflusst. Der Dissoziationsgrad der als Elektrolyt gewählten schwachen Säure oder Base ist abhängig vom pH-Wert und bestimmt in erster Linie die Ionen-Nettoladung und damit die Nettobeweglichkeit der Teilchen (23).

MAURER (64) faßt die die elektrophoretische Wanderung bedingenden bzw. beeinflussenden und sich auch gegenseitig beeinflussenden Parameter zusammen: Größe, Gestalt, Konzentration, elektrische Ladung, Hydratation und Dissoziationsgrad des Teilchens; Viskosität, pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke des Mediums; elektrische Feldstärke, Elektrophorese-Zeit und Länge der Trennstrecke.

Die Proteine wandern als amphotere Stoffe im sauren Milieu als Kationen und im alkalischen als Anionen. Somit ist bei der Auftrennung von Proteinen die wirksame Ladung und damit die Wanderungsrichtung vom pH-Wert des Mediums abhängig (5).

Bei der Elektrophorese werden die zu untersuchenden Stoffgemische immer in oder auf einem Trägermedium aufgetrennt. Da die einzelnen Banden, entsprechend der vorhandenen Eiweißmenge, unterschiedlich ausgeprägt sind, können die verschiedenen Fraktionen nach Abschluß der Untersuchung sogar quantitativ ausgewertet werden (40).

Für den elektrophoretischen Nachweis von aME in Fleischwaren verwendeten VAN BAAL und LEGET (3) Filterpapier, VAN GILS und HIDSKES (21) Celluloseacetatfolien, OLSMAN und Mitarb. (69) Stärkegel und FREIMUTH und KRAUSE (19), ROUT (84), SPELL (95) sowie HOFMANN und PENNY (40) Polyacrylamid-Gel als Trägermaterial.

2.2. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

2.2.1. Bildung und Struktur des Polyacrylamid-Gels

Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) ist das Polymerisations- und Vernetzungsprodukt des Acrylsäureamids ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) und eines Vernetzers, in der Regel N,N'-Methylenbisacrylamid ('Bisacrylamid; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Die PAA-Ketten entstehen durch Ko- oder Mischpolymerisation in Lösung. Sie vernetzen dort, wo das 'Bisacrylamid in die Polymerketten eingebaut ist und bilden das dreidimensionale Maschenwerk des PAA-Gels (64).

Viskosität, Elastizität und Festigkeit des Gels sind vom Polymerisationsgrad (= Kettenlänge) und vom Vernetzungsgrad, d.h. der Menge des zugesetzten Vernetzers, abhängig (70). Liegt das Mengenverhältnis Acrylamid zu 'Bisacrylamid unter 10:1, so werden die entstandenen Gele brüchig, starr und trübe; übersteigen sie 100:1, so sind 5%ige Gele (bezogen auf Acrylamid) pappig und zerfallen leicht. Völlig transparente und elastische Gele erhält man bei einem Quotienten von etwa 30:1, wobei die Acrylamidkonzentration nicht unter 3% liegen darf (74). Untersuchungen von DAVIS (10) zeigen, daß mit dem Ansteigen der Monomer- (= Acrylamid-) Konzentration im allgemeinen ein Abfallen der

Komonomer (= 'Bisacrylamid)-Konzentration einhergehen sollte, um elastische Gele zu erzielen.

RICHARDS und Mitarb. (82) schlagen deshalb folgende "Kompromißformel" vor:

$$C = 6,5 - 0,3 T$$

wobei sich T aus $\frac{b}{a + b} \times 100 [\%]$ und

C aus $\frac{a + b}{m} \times 100 [\%]$ errechnet.

a = Acrylamid (g)

b = 'Bisacrylamid (g)

m = Puffermenge (ml)

C ist also der prozentuale Anteil des Komonomers (= Vernetzers) an der Gesamtkonzentration von Monomer und Komonomer. T ist die Gesamtkonzentration von Monomer und Komonomer im Gesamtvolumen.

Für den Molekularsiebeffekt ist die durchschnittliche Porengröße des PAA-Gels entscheidend. Die Porengröße ist von der Dichte des Gelgitterwerkes abhängig, die wiederum durch die Konzentration sowie den Polymerisations- und Vernetzungsgrad bestimmt wird (64).

2.2.2. Kontinuierliche und diskontinuierliche (Disk-) Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Nach ORNSTEIN (70) und DAVIS (10) handelt es sich bei der Disk-Elektrophorese um ein System, das mit PAA-Gel als Trägersubstanz mit unterschiedlichem pH-Wert, unterschiedlicher Pufferzusammensetzung und Gelkonzentration arbeitet. Diese Diskontinuitäten erzeugen vor der Auftrennung der Eiweiße schmale, konzentrierte Zonen, die als Ausgangsposition für eine hohe Trennschärfe entscheidend sind. Zwei physikalische Erscheinungen sind verantwortlich für das hohe Auflösungsvermögen

in der Disk-Elektrophorese, nämlich der Konzentrations- sowie der Molekularsiebeffekt.

RAYMOND und WEINTRAUB (80) sowie HJERTEN und Mitarb. (39) lehnen diskontinuierliche Systeme ab. Sie verwenden dagegen homogene Puffersysteme mit einheitlichem pH-Wert und erhalten auch in diesen kontinuierlichen Systemen scharfe Startzonen.

2.2.3. Molekularsieb- und Konzentrationseffekt

In der Papierelektrophorese, die eigentlich eine Flüssigkeits-Elektrophorese ist, werden elektrisch aufgeladene Teilchen ausschließlich entsprechend ihrer Netto-Ladung aufgetrennt.

Gele besitzen gegenüber flüssigen Medien hohen Viskositätsgrad und hohen Reibungswiderstand. Diese Trägermedien verhindern eine Konvektion und beschränken die Diffusion auf ein Minimum. Sie beeinflussen in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße die elektrophoretische Wanderung der aufzutrennenden Teilchen (64). Demzufolge werden in Stärke- und PAA-Gel die Teilchen nicht nur nach ihrer elektrischen Ladung getrennt, sondern auch nach Molekülgröße und Form "ausgesiebt". Diese Erscheinung bezeichnet SMITHIES (93) als "molecular sieving effect". Nach SMITHIES (94) und ORNSTEIN (70) ist die Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit eines Teilchens durch das Gel-Netzwerk von der Acrylamidkonzentration abhängig.

Der durchschnittliche Porendurchmesser eines Gels ist nach RAYMOND und NAKAMICHI (79) umgekehrt proportional der Wurzel aus der Volumenkonzentration des Polymers.

Wenn eine in verschiedenen Zonen des Gels durch veränderten pH-Wert für Anionen und Kationen erhöhte Leitfähigkeit gegeben ist, werden die Proteine, der sogenannten "beharrlichen Funktion" von KOHLRAUSCH (50) folgend, vor ihrer Auftrennung zu einer möglichst schmalen

Startzone zusammengedrängt. Dabei bleibt die Summe (t) über alle Quotienten aus den Konzentrationen c und den Beweglichkeiten m der Komponenten B^+ (= Kationen) und A^- (= Anionen) unverändert:

$$\sum \frac{c_{B^+}}{m_{B^+}} + \frac{c_{A^-}}{m_{A^-}} = F \quad (2)$$

Eine Konzentrierung der Proteine kann neben der Veränderung des pH-Wertes auch dadurch erreicht werden, daß die Probe in einem Puffer von geringerer Ionenstärke als das trennende Medium aufgelöst wird. Die Probenlösung erhält dadurch eine geringere Leitfähigkeit (39).

2.2.4. Vorgänge bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese

MAURER (63) bezeichnet die beiden Ionenarten, die während der Elektrophorese in Trennrichtung mit den Proteinen wandern und den Regulationseffekt nach KOHLRAUSCH (50) bedingen als Leitionen und Folgeionen. Zu Anfang der Elektrophorese befinden sich dabei die Leitionen in allen Gelteilen, während sich die Folgeionen nur im Elektrodenpuffer befinden. Wird der richtige pH-Wert für die Gele gewählt, so stellen sich die Beweglichkeiten aller Ionenarten so ein, daß, bei gleicher Wanderungsrichtung, die Leitionen schneller als die Proteine, und diese wiederum schneller als die Folgeionen sind. Die Leitionen wandern unter Stromeinfluß schneller als die Proteine und lassen eine Zone geringerer Leitfähigkeit hinter sich. Da die Feldstärke umgekehrt proportional zur Leitfähigkeit ist, entsteht hinter den Leitionen eine Zone höherer Feldstärke. Die Proteine und Folgeionen werden dadurch beschleunigt und sammeln sich hinter den Leitionen an.

Nachdem die Wanderungsgeschwindigkeit dem Produkt aus Beweglichkeit und Feldstärke gleich ist (6), bewegen sich alle Ionenarten dann gleich schnell, wenn die Produkte aus Feldstärken und den jeweiligen Beweglichkeiten gleich sind:

$$v = E_L \cdot u_L = E_F \cdot u_F$$

v = Geschwindigkeit; L = Leitonen;
 E = Feldstärke; F = Folgeionen.
 u = Beweglichkeit;

Zwischen den Leit- und Folgeionen kommt es zur Bildung einer Grenzschicht, die zwischen den beiden Feldstärken liegt. Wenn sich diese "wandernde Grenzschicht" schnell durch Proben- und Sammelgel bewegt, werden die Proteine aufgrund der verschiedenen Beweglichkeiten zwischen Folge- und Leitonen zu einer schmalen Zone zusammengestaucht. Hat die konzentrierte Proteinzone die Grenze zum Trenngel erreicht, wird infolge des anderen pH-Wertes im Trenngel der Dissoziationsgrad und damit die Beweglichkeit der Folgeionen um ein Vielfaches gesteigert. Die Folgeionen überholen dann die Proteine, die anschließend bei einheitlicher Feldstärke und einheitlichem pH-Wert in einer "echten" Zonenelektrophorese aufgetrennt werden (63). Den gleichen Effekt konnte ALLEN (1) durch Änderung der Ionenstärke der verwendeten Gel-Puffer erreichen.

2.3. Der Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen mit Hilfe der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Bereits 1968 berichteten FREIMUTH und KRAUSE (18) erstmals über den Nachweis von Fremdproteinen in Fleischerzeugnissen mit Hilfe der PAA-Gel-Elektrophorese. Erst 1969 beschreiben sie (19) in ihrem Bericht über den Nachweis von Bindemitteln auf Milcheiweiß-Basis in Fleischerzeugnissen das Nachweisverfahren. Die Verfasser identifizieren dabei Milcheiweiß aufgrund seiner typischen Caseinbanden (α - und β -Casein). Die Elektrophorese führen sie in einem 8%igen PAA-Gel mit Harnstoff-Boratpuffer nach SMITHIES (92) durch. Mit diesem Puffer extrahieren sie auch das Milcheiweiß aus entfetteten Fleischerzeugnissen. Jeweils 2 μ l des Extraktes werden dann bei 140 V und 15 mA innerhalb von

90 Minuten aufgetrennt. Die Autoren berichten über gute Untersuchungsergebnisse und die Möglichkeit einer halbquantitativen Bestimmung.

ROUT (84) konnte mit Hilfe der Disk-Elektrophorese nach DAVIS (10) einen 5%igen Zusatz von Casein zu Wurst "mit Leichtigkeit" nachweisen. Er macht allerdings keine weiteren Angaben über die Art der Identifizierung und die Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung.

SPELL (95) verwendete für den Nachweis von Milcheiweiß in Fleisch-erzeugnissen das von MAURER (64) vorgeschlagene Gelsystem Nr. 1 (diskontinuierlicher pH-Wert) in Verbindung mit einem Tris-Borsäurepuffer (pH 8,7). Zwei zusätzlich auftretende Banden, die dem Casein zugeordnet werden können, sprechen für einen Zusatz von Milcheiweiß. Mit dieser Methode kann aME in Wurstwaren auch nach Erhitzung auf 120°C in Konzentrationen von weniger als 2% nachgewiesen werden. Selbst durch zusätzliche Verarbeitung von Sojaseiweiß soll der Nachweis von aME nicht beeinflusst werden.

HOFMANN und PENNY (40) modifizierten die PAA-Gel-Elektrophorese. Sie verwenden im Elektrodenpuffer Na-Dodecylsulfat (SDS) und erreichen dadurch, daß jedes Molekül von einer negativ geladenen SDS-Hülle umgeben wird. Da die elektrische Ladung aller Moleküle dadurch gleich wird, wandern sie alle in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße zur Anode. Die zwischen der Laufstrecke und dem Logarithmus der Molekulargewichte bestehende lineare Beziehung erlaubt es, Proteine zu identifizieren und anhand von Standards auch deren Molekulargewichte zu bestimmen. Diese Methode scheint für den quantitativen Nachweis von Fremdeiweiß in Fleischerzeugnissen geeignet zu sein.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Vorversuche

1.1. Gelsystem

Die Untersuchungen wurden mit dem Elektrophorese-Gerät Nr. 146200 in Verbindung mit dem Netzgerät Nr. 121252 der Firma Desaga, Heidelberg, durchgeführt. Orientierende Versuche erfolgten mit Lösungen von Casein (Serva, Nr. 16260) und einem bestimmten aME-Präparat.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde das von MAURER (64) vorgeschlagene Gelsystem Nr. 1 (pH-Bereich von 6,9 bis 8,9) verwendet, das sich für die Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 10^4 bis 10^6 eignet. Das Sammelgel (pH 6,9) sollte durch Lichteinfluß mit Hilfe von Riboflavin als Photokatalysator polymerisiert werden.

Es zeigte sich jedoch, daß das Sammelgel selbst bei Zuhilfenahme eines UV-Tageslicht-Tunnels nicht oder nur unvollständig zur Polymerisation zu bringen war. Die Konsistenz des Gels war gallertig, so daß sich die Wandungen der Probenaschen nach Entfernung des Teflonkammes aneinanderlegten. Ein blasenfreies Einbringen der Proben war nicht möglich. Außerdem bestand die Gefahr, daß die Probenlösungen von einer in die andere Tasche überlaufen.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde deshalb die Lösung Nr. 4 durch die Lösung Nr. 4a ersetzt (64). Auch wurde versucht, die Polymerisation - wie bereits im Trenngel - mit Hilfe von Persulfat durchzuführen. Das Sammelgel setzte sich wie folgt zusammen:

1 Teil Lösung 4a, 2 Teile Lösung 5, 4 Teile Persulfatlösung.

Im weiteren wurden Trenngel-Konzentrationen von 4%, 6%, 7,5% und 10% auf ihre Eignung geprüft. Mit einer 7,5%igen Gelkonzentration konnten die besten Ergebnisse erzielt werden. Trotz sorgfältiger Ausführung

erfolgte vereinzelt keine Polymerisation oder die Laufspuren wiesen keine Banden auf.

Im weiteren wurde deshalb versucht, aME mit dem Gelsystem darzustellen, das KOLB (51) zur Untersuchung des Enzymmusters der menschlichen Haut verwendet hatte. Bei diesem Gelsystem beträgt die Polyacrylamid-Konzentration 8% und der kontinuierliche pH-Wert 9,0. Der alkalische Elektrodenpuffer bot sich für die Extraktion von aME aus Fleischerzeugnissen an.

Mit diesem Gelsystem war die Polymerisation zu sichern. Die Polymerisationszeit konnte auf 20 Minuten verkürzt werden.

1.2. Auftragen der Proben

Die Proben wurden in unterschiedlicher Menge (von 10 μ l bis 100 μ l) mit einer 100- μ l-Glasspritze eingefüllt. Um eine Verletzung der Wandungen der Geltaschen durch die Metallkanüle auszuschließen, wurden später Eppendorf-Mikropipetten verwendet.

Die aus einem mit 2% aME versetzten Fleischerzeugnis extrahierte Menge an aME (4,5 mg/ml) entsprach in etwa der einer 0,5%igen reinen aME-Lösung (5 mg/ml). Da für die 0,5%ige Lösung eine Auftragsmenge von 20 μ l als Optimum ermittelt worden war, wurden auch 20 μ l der Wurstextrakte zur Untersuchung verwendet.

1.3. Stromstärke und Spannung

Ein Netzgerät, das pulsierenden Gleichstrom erzeugt (51), stand nicht zur Verfügung. Es wurde deshalb das Desaga-Netzgerät Nr. 121262 benutzt.

Nach Versuchen zur Ermittlung optimaler Bedingungen bei konstanter Spannung und variierender Stromstärke sowie bei variierender Spannung und konstanter Stromstärke wurde die Stromstärke auf 50 mA festgelegt. Die Spannung stieg dabei von 140 V auf 400 V an.

1.4. Färbung und Entfärbung

Die Färbung der Gelplatten mit Coomassie Brilliant Blue R 250 (0,25%ig in 9%iger Essigsäure gelöst mit Zusatz von 45% Methanol) (62) wurde nicht weiter durchgeführt, sondern das von KOLB (51) beschriebene Färbeverfahren angewendet (0,9% Coomassie Brilliant Blue R 250 in Aqua dest. gelöst, mit einem Zusatz von 45% Methanol und 10% Essigsäure).

Die Art der Entfärbung (elektrophoretisch in 3,75%iger Essigsäure) wurde beibehalten. Durch die Verwendung eines Netzgerätes, das 800 mA abgab, konnte die Entfärbezeit von etwa 12 Stunden auf 30 Minuten verkürzt werden.

2. Hauptversuche

2.1. Material

2.1.1. Aufgeschlossene Milcheiweiß-Präparate und Vergleichs-substanzen

Im Rahmen der Untersuchungen wurden 17 verschiedene aME-Präparate auf ihre Zusammensetzung geprüft. Die Präparate unterschieden sich in ihrer Herstellung (Sprüh-, Walzenpräparate) sowie in der Verwendung des Ausgangsmaterials (unerhitzte, erhitzte Milch; Lab-casein). Die Präparate sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: aME-Präparate

Nr.	Präparat	Herkunfts- land	Besonderheiten
1	Na-Caseinat LE	Holland D.M.V.Lab.	Walz-Na-Caseinat aus Labcasein
2	Rovita FN 5	Deutschland	Walz-Na-Caseinat
3	Scottish Milk Board	England	Sprüh-Na-Caseinat
4	EM 6	Holland D.M.V.Lab.	Walz-Na-Caseinat
5	Lidano	Dänemark	Walz-Na-Caseinat
6	Havero	Frankreich	Walz-Na-Caseinat
7	Canada	Kanada	Sprüh-Na-Caseinat
8	Na-Caseinat RM	Holland D.M.V.Lab.	Walz-Na-Caseinat aus unerhitzter Milch
9	EM-HV	Holland D.M.V.Lab.	Walz-Na-Caseinat
10	Sancor	Argentinien	Sprüh-Na-Caseinat
11	Mavar	Finnland	Na- und Ca-Caseinat Sprühprodukt
12	Na-Casein HM	Holland D.M.V.Lab.	Walz-Na-Caseinat aus hocherhitzter Milch
13	Dena	Deutschland	Sprüh-Na-Caseinat
14	Vitessa	Belgien	Walz-Na-Caseinat
15	Na-Caseinat FR	Frankreich	Walz-Na-Caseinat
16	Rovita FN 5	Holland	Walz-Na-Caseinat und Dickungsmittel
17	Gervita S	Deutschland	Walz-Na-Caseinat

Als Vergleichssubstanzen wurden die Präparate Casein (Serva Nr. 16260), Lactalbumin pract. (Serva, Nr. 27390), Lactoglobulin vom Rind, krist., rein (Serva, Nr. 27440), α_1 -Casein für biochemische Zwecke (Merck, Nr. 2246) sowie handelsübliches Magermilch-, Vollmilch- und Molkenpulver verwendet.

2.1.2. Wurstzusatzmittel

Untersucht wurden 14 Wurstzusatzmittel, u.a. Trockenblutplasma, Soja-Eiweiß sowie verschiedene Pflanzeneiweiß-Präparate, 4 Kutterhilfsmittel (Handelsware) und 3 "Gewürzmischungen" (Handelsware).

2.1.3. Modellchargen mit bekanntem aufgeschlossenem Milcheiweiß-Zusatz

Für die Untersuchungen wurden Modellchargen nach folgender Grundrezeptur hergestellt:

40% Rindfleisch

35% Speck

25% Eis

15 g Nitritpökelsalz, 4 g Gewürzmischung und 1 g Natrium-Ascorbat je kg Brät.

Die Grundrezepturcharge war zugleich Kontrollcharge. Den weiteren Chargen wurde aME bzw. anderes Fremdeiweiß in verschiedenen Konzentrationen (bezogen auf verwendete Fleisch- und Fettmenge) zugegeben (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammenstellung der Modellchargen

aME-Zusatz in %	sonstiger Fremdeiweiß- zusatz in %	Erhitzung(°C)
-	-	70
0,50	-	roh/70/120
0,75	-	roh/70/120
1,00	-	roh/70
1,25	-	roh
1,50	-	roh
2,00	-	roh/70/120
2,00*	-	120
3,00	-	roh/70/120
4,00	-	120
5,00	-	120
1,00	1% Trockenblutplasma	70/120
1,00	1% Sojaweiß	70/120
1,00	3% Hühnereiweiß	70/120

* aME mit Fett voremulgiert

2.1.4. Fleischerzeugnisse aus dem Handel mit deklariertem aufgeschlossenem Milcheiweiß-Zusatz

Bei den aus dem Handel bezogenen Wurstwaren handelte es sich um sechs Vollkonserven mit deklariertem aME-Zusatz (zweimal Bierwurst, Jagdwurst, Schinkenwurst, Mortadella und Tafelfertiges Frühstücksfleisch). Konzentration des Fremdeiweißgehaltes sowie der Erhitzungsgrad der Erzeugnisse waren nicht bekannt.

2.2. Methode

In den Hauptversuchen wurde folgende Methode angewendet:

2.2.1. Vorbereitung der Proben

2.2.1.1. Auflösung der Reinsubstanzen

Die zu untersuchenden Präparate wurden in Tris-Borat-Puffer verbracht und mit dem Ultra-Turrax einige Sekunden gut durchmischt. Das Gemisch wurde 15 Minuten auf 70°C bzw. 120°C erhitzt.

2.2.1.2. Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß aus Fleischerzeugnissen

Der gesamte Doseninhalt der Fleischerzeugnisse wurde im Braun-Mixgerät gründlich zerkleinert. Anschließend wurden 6,6 g dieser Masse in 20 ml Tris-Borat-Puffer verbracht und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Wurde das Probenmaterial vor der Untersuchung lyophilisiert, so wurden 5 g Lyophilisat mit 20 ml Puffer vermischt.

Nach Inkubation im Brutschrank bei 37°C für mindestens 12 Stunden wurde der Extrakt bei 10.000 U/min 15 Minuten zentrifugiert. Der opaleszierende Überstand wurde zur Elektrophorese verwendet.

2.2.2. Durchführung der Elektrophorese

Für die Elektrophorese werden die Einzelteile des Arbeitsblockes zusammengesetzt und in die Gießvorrichtung eingespannt. Zwischen die Moosgummi-Unterlage der Gießvorrichtung und den Arbeitsblock wird ein Streifen Parafilm gelegt. Damit keine Luftblasen entstehen können, wird mit einer Injektionsspritze (10 oder 20 ml), die mit einem dünnen PVC-Schlauch versehen ist, bis zu einer Höhe von 6 cm 8%ige Polyacrylamidgel-Lösung vorsichtig eingefüllt. Mit einer Tuberkulinspritze mit gebogener, stumpfer Kanüle wird behutsam mit 6%iger und danach 3,5%iger Polyacrylamidgel-Lösung jeweils 0,5 cm hoch überschichtet. Um eine Meniskusbildung zu vermeiden, wird darauf Aqua dest. geschichtet.

Nach erfolgter Polymerisation, die etwa 20 Minuten dauert, wird der Wasserüberstand abgesaugt und die Geloberfläche mit weichem Filterpapier (z.B. Kleenex) getrocknet. In das 8%ige Proben-Gel, das darauf gegossen wurde, wird ein Teflonkamm zur Bildung der Proben-taschen verbracht. Wenn dieses Gel polymerisiert ist, wird der Teflonkamm entfernt. Die in den Proben-taschen verbliebene nicht polymerisierte Lösung wird durch Umdrehen der Gießvorrichtung und Absaugen mit Filterpapierstreifen entfernt.

In die jetzt trockeneten Proben-taschen werden mit einer Eppendorf-Mikropipette jeweils 20 μ l des zu untersuchenden Extraktes eingefüllt und mit 8%iger Proben-Gel-Lösung bis 5 mm unter dem oberen Rand der Gel-taschen abgedeckt. Nach dem Polymerisieren dieser Schicht wird nochmals bis zum Niveauausgleich Proben-Gel-Lösung aufgetragen.

Der Extrakt ist somit im Proben-Gel eingeschlossen und ein Überlaufen von einer Geltasche in die andere ist nicht mehr möglich.

Während die dritte Proben-Gel-Schicht polymerisiert, kann bereits das untere Elektrodengefäß mit Tris-Borat-Puffer bis knapp über die Trageleiste für den Arbeitsblock gefüllt werden.

Nach Polymerisation der dritten Schicht des Proben-Gels wird der Arbeitsblock aus der Spannvorrichtung genommen und auf die Trageleiste des unteren Elektrodengefäßes gestellt, wobei er einige Millimeter tief in den Elektrodenpuffer ragt. Darauf wird das obere Elektrodengefäß aufgesetzt und mit dem unteren verbunden. Das obere Gefäß wird jetzt bis zum Eintauchen der Platin-Elektrode mit dem selben Puffer gefüllt und mit 2 ml einer 0,001%igen Bromphenol-Blau-Lösung zur Sichtbarmachung der "wandernden Grenzschicht" versetzt.

Die Auftrennung erfolgt 80 Minuten bei 50 mA und einer Spannung, die während des Laufes von 140 V auf 400 V ansteigt. Wenn die wandernde Grenzschicht den unteren Rand der Gel-Scheibe erreicht hat, wird das

Netzgerät ausgeschaltet und der Arbeitsblock entnommen. Die Gel-Scheibe wird vorsichtig (Bruchgefahr) von der Glasplatte abgelöst und für 30 Minuten in eine Petrischale mit 12,5%iger Trichloressigsäure gelegt und anschließend 5 Minuten gewässert.

2.2.3. Auswertung

2.2.3.1. Färbung und Entfärbung

Die entstandenen Proteinbanden werden durch die Anfärbung mit einem proteinaffinen Farbstoff für das Auge sichtbar gemacht und können dann photometrisch ausgewertet werden. Das Gel wird über 30 Minuten in alkoholischer Coomassie-Blue-Färbelösung, die im Wasserbad bei 65°C gehalten wird, gefärbt.

Die Entfärbung der Gel-Scheiben erfolgt elektrophoretisch im Desaga Entfärbebad (Nr. 146220) mit 3,75%iger Essigsäure. Die Entfärbeflüssigkeit wird dabei mit Hilfe einer elektrisch betriebenen Pumpe einem Kreislauf unterworfen, in den ein mit Leitungswasser gekühlter Aktivkohle-Filter eingeschaltet ist. Durch die Kühlung wird eine zu starke Erhitzung der Entfärbeflüssigkeit verhindert. Durch die Verwendung eines eigenen Netzgerätes (800 mA) konnte die Entfärbezeit von ca. 12 Stunden auf eine halbe Stunde reduziert werden.

2.2.3.2. Densitometrie

Die planen Polyacrylamid-Gele können ohne weitere Vorbehandlung einer photometrischen Auswertung unterworfen werden. Bei dem verwendeten "Cellomatic" Densitometer (Serva, Heidelberg) werden die Gele entlang den Laufspuren an einer Lichtquelle vorbeigefahren, die Extinktion gemessen und zugleich mit einem angeschlossenen Schreiber als Kurve aufgezeichnet. Die für aME typischen Banden werden entsprechend ihrer Lage und Intensität graphisch dargestellt.

Nach der Auswertung können die Gele in 10%iger Essigsäure aufbewahrt werden.

2.2.4. Verwendete Reagenzien

Elektrodenpuffer (Tris-Borat-Puffer), pH 9; 0,0655 m

Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, rein (Serva, Nr. 37190)	31,44 g
Borsäure (Riedel-de Haën, Nr. 11607)	4,37 g
Aqua dest.	ad 2000,0 ml

Gelpuffer 1 b (Trissulfat), pH 9; 1,5 m

Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	36,3 g
1 n Schwefelsäure	62,0 ml
Tetramethyläthylendiamin (TEMED) (Serva, Nr. 35925)	0,48 ml
Aqua dest.	ad 200,0 ml

Gelpuffer 2 b (Trissulfat), pH 9; 0,3 m

Trissulfat 1,5 m (s. 1 b-Gelpuffer)	20,0 ml
TEMED	0,19 ml
Aqua dest.	ad 100,0 ml

Acrylamid-Lösung 32%ig

Acrylamid reinst (Serva, Nr. 10675)	54,4 g
N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis) (Serva, Nr. 29195)	1,8 g
Aqua dest.	ad 115,0 ml

Ammoniumpersulfatlösung 0,21%ig (Persulfat)

Ammoniumpersulfat p.a. (Serva, Nr. 13375)	0,21 g
Aqua dest.	ad 100,0 ml

Trenn-Gel-Lösung 8%ig

32%ige Acrylamidlösung	5,10 ml
1 b-Puffer	5,10 ml
Aqua bidest.	6,90 ml
Persulfat	3,30 ml

Trenn-Gel-Lösung 6%ig

32%ige Acrylamidlösung	0,90 ml
1 b-Puffer	1,20 ml
Aqua bidest.	1,90 ml
Persulfat	0,80 ml

Sammel-Gel-Lösung 3,5%ig

32%ige Acrylamidlösung	0,35 ml
2 b-Puffer	0,80 ml
Aqua bidest.	1,45 ml
Persulfat	0,60 ml

Proben-Gel 8%ig

32%ige Acrylamidlösung	1,00 ml
2 b-Puffer	1,00 ml
Persulfat	2,00 ml

Bromphenolblaulösung 0,001%ig in Aqua dest.

Bromphenolblau (Serva, Nr. 15375)

Fixierung

Trichloressigsäure (Merck, Nr. 807)	12,50 ml
Aqua dest.	ad 100,00 ml

Färbung

Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Nr. 17525)	0,9 g
Aqua dest.	450,0 ml
Aethanol absol. (DAB 7)	450,0 ml
Essigsäure konz. (DAB 7)	100,0 ml

Entfärbung

Essigsäure konz. (DAB 7)	37,5 ml
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

Aufbewahrung

Essigsäure konz. (DAB 7)

100,0 ml

Aqua dest.

ad 1000,0 ml

2.3. Ergebnisse

2.3.1. Vergleich der aufgeschlossenen Milcheiweiß-Präparate mit Casein

Die in Tabelle 2 (S. 30) zusammengefaßten Präparate wurden direkt mit einer Casein-Lösung gleicher Konzentration verglichen.

Bei den Untersuchungen hat sich gezeigt, daß zwischen reinem, mit heißem Petroläther extrahiertem Casein (Serva, Nr. 16260) und den im Handel erhältlichen aME-Präparaten keine signifikanten Unterschiede bestehen.

Die Abbildungen 1 - 6 zeigen einige Densitogramme von aME-Präparaten im Vergleich mit reinem Casein. Für die Abbildungen wurden ein Sprüh- und ein Walzenprodukt sowie ein Walz-Na-Caseinat aus unerhitzter Milch und ein Walz-Na-Caseinat aus hoherhitzter Milch ausgewählt.

Abb. 1: Vergleich zwischen aME-Präparat Nr. 1 (Walz-Na-Caseinat aus Labcasein) und Casein

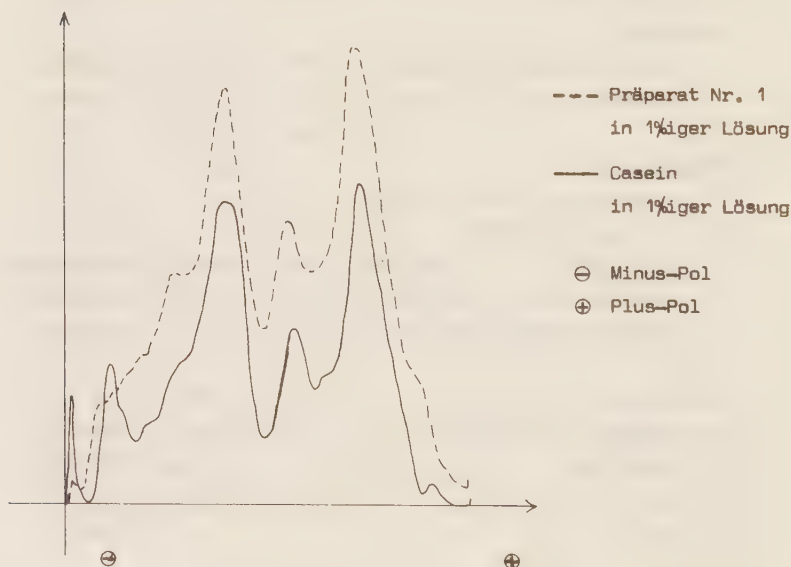


Abb. 2: Vergleich zwischen aME-Präparat Nr. 2 (Walz-Na-Caseinat) und Casein

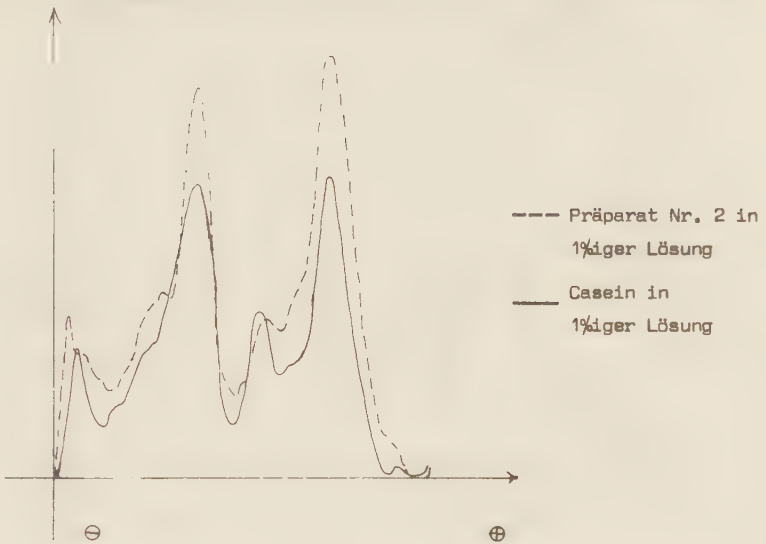


Abb. 3: Vergleich zwischen Walz-Na-Caseinat (Präparat Nr. 2) und Sprüh-Na-Caseinat (Präparat Nr. 3) sowie Casein

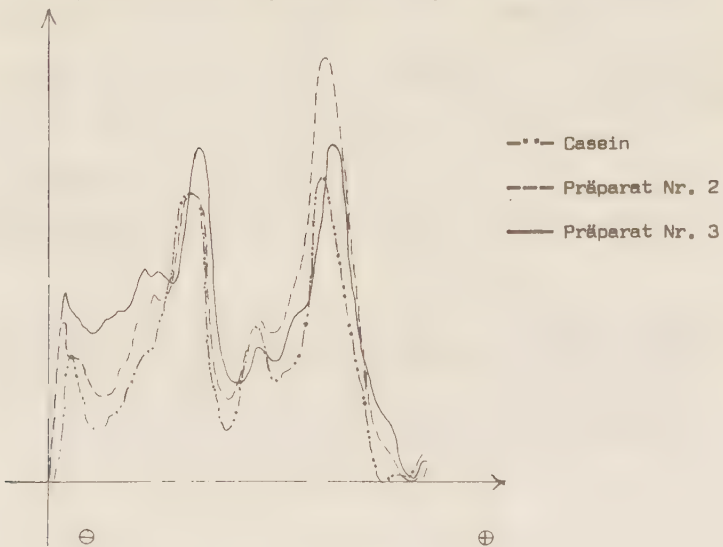


Abb. 4: Vergleich zwischen Walz-Na-Caseinat aus unerhitzter Milch (Präparat Nr. 8) und aus hocherhitzter Milch (Präparat Nr. 12) sowie Casein

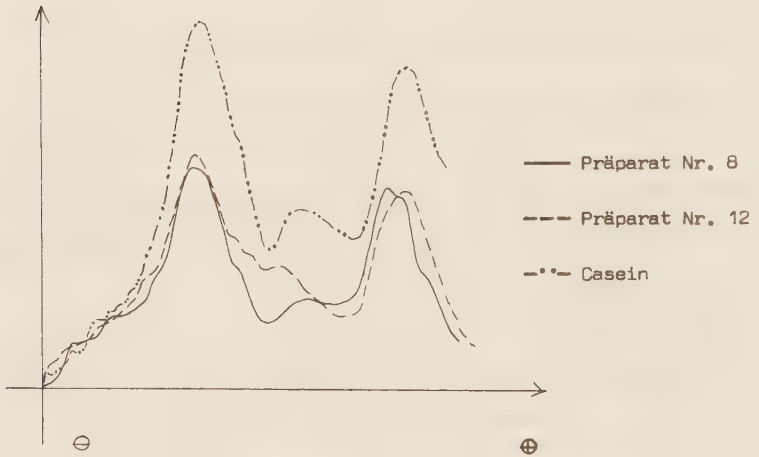


Abb. 5: Vergleich zwischen aME-Präparat Nr. 13 (Sprüh-Na-Caseinat) und Casein

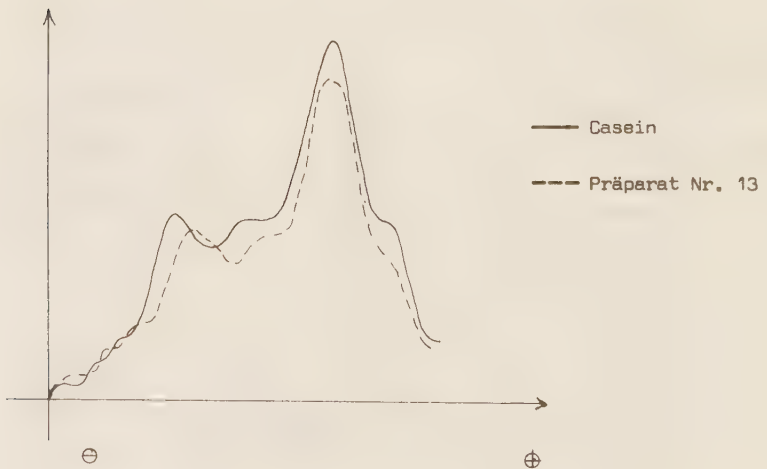
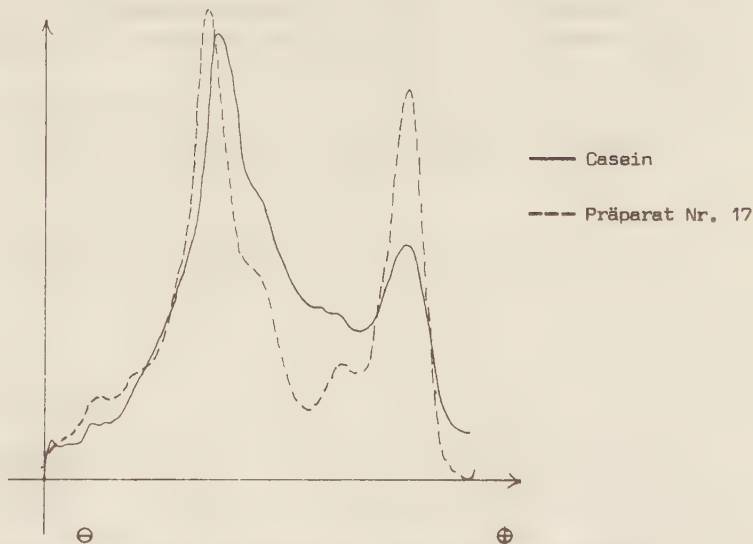


Abb. 6: Vergleich zwischen aME-Präparat Nr. 17 (Walz-Na-Caseinat) und Casein



Wie aus Abbildung 3 ersichtlich ist, konnten zwischen Sprüh- und Walzenprodukten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden.

Auch die Verwendung verschiedener "Ausgangsmaterialien" zur Herstellung der aME-Präparate wie Labcasein (Abb. 1), unerhitzte und erhitzte Milch (Abb. 4) veränderte im Vergleich zu Casein das Bandenbild nicht.

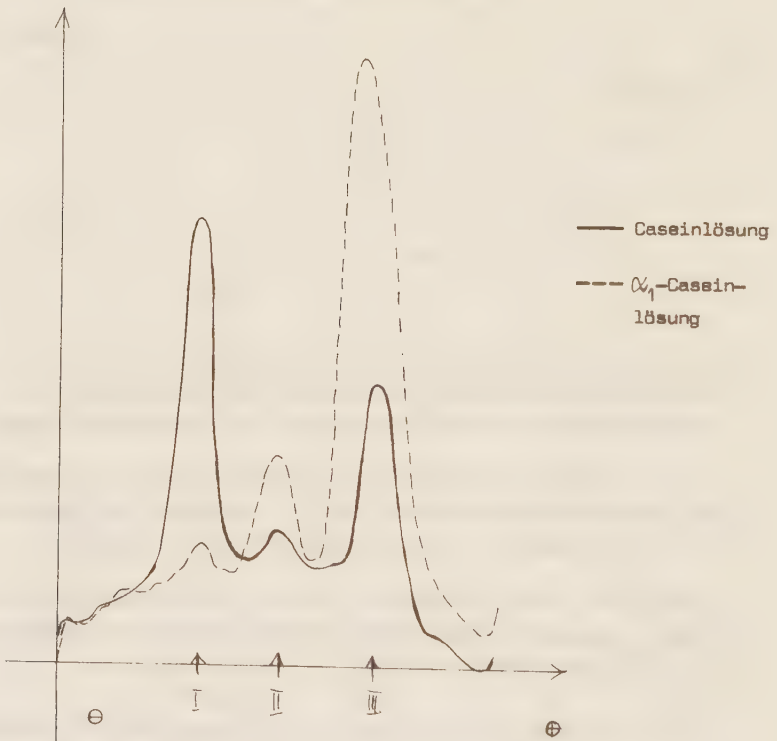
Auffällig ist jedoch die unterschiedliche Intensität der für α - bzw. β -Casein gehaltenen Banden sowohl innerhalb eines Gels als auch von Gel- zu Gelansatz (Abb. 1 - 6).

Die Densitogramme zeigen, daß trotz dieser unterschiedlichen Intensität die für α - und β -Casein gehaltenen Fraktionen mit denen der aME-Präparate identisch sind.

2.3.2. Identifizierung der Banden des Caseins

Um festzustellen, welchen Caseinfraktionen die beiden Banden der Casein-Präparate bzw. aME-Präparate zuzuordnen sind, wurde zum Vergleich eine α_1 -Caseinlösung aufgetragen (Abb. 7).

Abb. 7: Vergleich zwischen Casein und α_1 -Casein



Wie Abbildung 7 verdeutlicht, handelt es sich bei Peak III um α_1 -Casein. Der Peak II kann vermutlich einer weiteren α -Casein-Fraktion zugeordnet werden. Eine genaue Identifizierung dieses Peaks erschien

mir deshalb nicht wichtig, da diese Fraktion nicht Bestandteil aller aME-Präparate ist, und ihr somit keine Beweiskraft zukommt. Bei Peak I handelt es sich wahrscheinlich um β -Casein. Reines β -Casein stand für einen direkten Vergleich nicht zur Verfügung.

Die folgenden Vergleichsuntersuchungen sollten klären, inwieweit Ähnlichkeiten zwischen anderen Milcheiweißbestandteilen und Casein bestehen (Abb. 8 und 9).

Abb. 8: Vergleich zwischen Casein, Lactalbumin, Lactoglobulin und Magermilchpulver

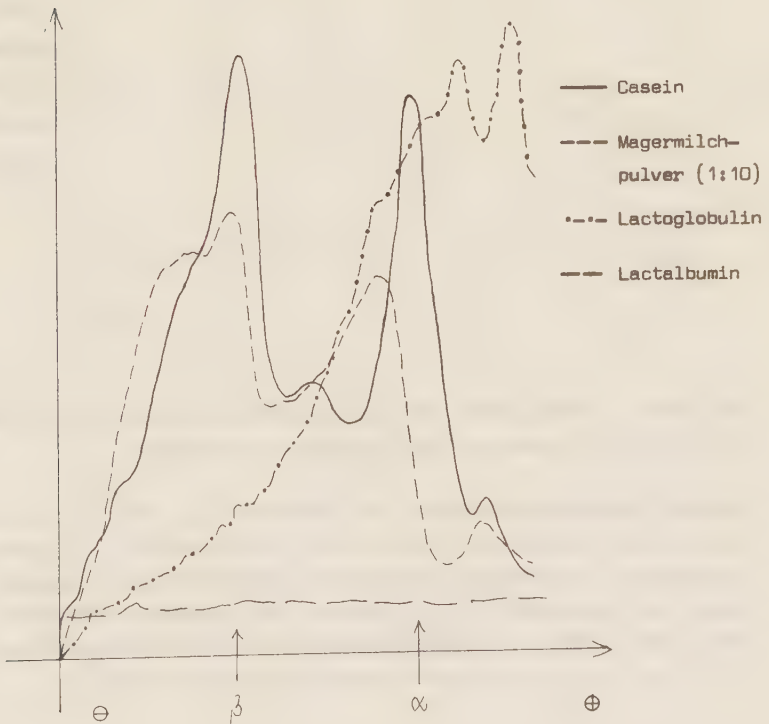


Abb. 9: Vergleich zwischen Casein, Vollmilchpulver und Molkenpulver

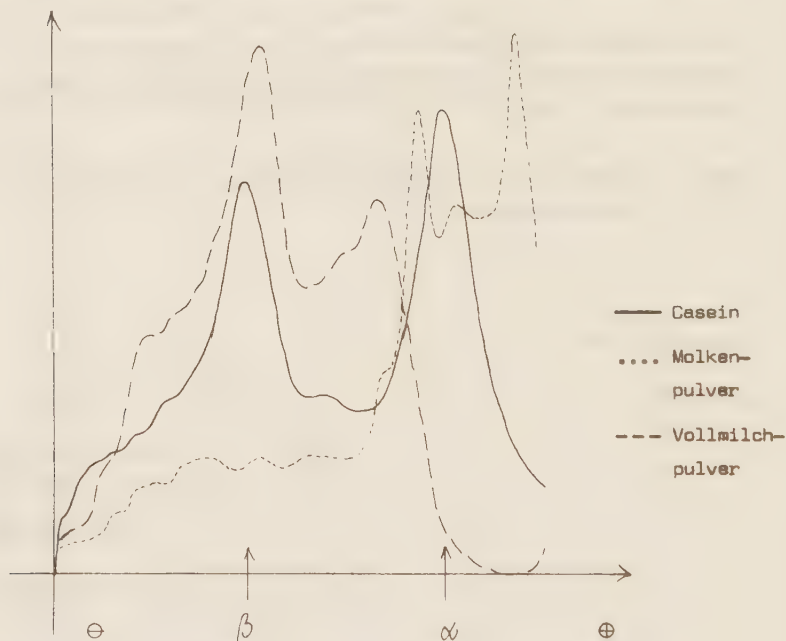


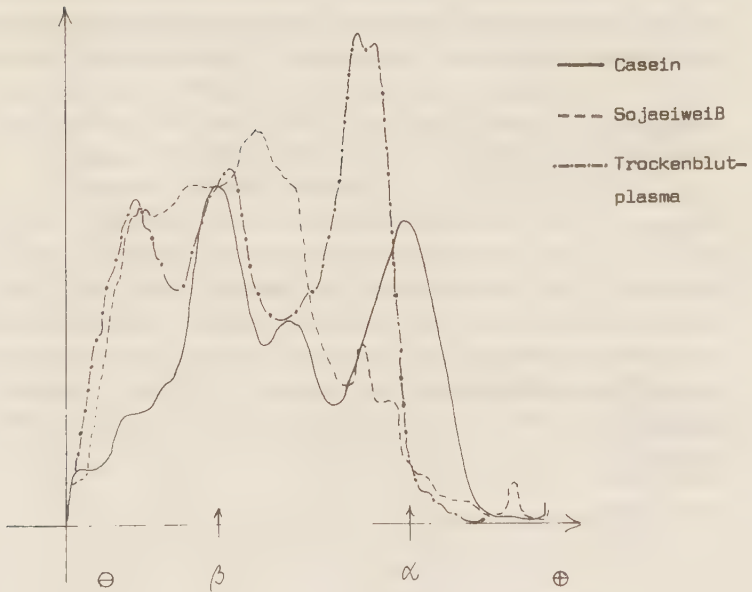
Abb. 8 und 9 verdeutlichen, daß sich die Banden der anderen Milcheiweißbestandteile mit denen von aME bzw. Casein nicht decken.

Nachdem sich bereits die Banden von Lactoglobulin am Ende des Gels befinden (Peaks am Ende des Densitogrammes) und Lactalbumin eine höhere elektrophoretische Beweglichkeit als Lactoglobulin besitzt, ist anzunehmen, daß Lactalbumin bei dem gewählten Versuchsansatz bereits das Gel durchlaufen hatte. In den Densitogrammen von Voll- und Magermilchpulver (Abb. 8 und 9) fehlt eine dem α_1 -Casein zuzuordnende Bande.

2.3.3. Vergleich anderer Wurstzusatzmittel mit Casein bzw. aufgeschlossenen Milcheiweiß-Präparaten

Um festzustellen, ob z.B. Gewürzmischungen und Kutterhilfsmittel, die zur Herstellung von Brühwürsten benutzt werden, einen Gehalt an aME vortäuschen bzw. den Nachweis beeinflussen können, wurden die in 2.1.2. aufgeführten Wurstzusatzmittel direkt mit aME- und Caseinlösungen verglichen.

Abb. 10: Vergleich zwischen Casein und Trockenblutplasma bzw. Sojaeiweiß



Bei 12 von den insgesamt 14 untersuchten Präparaten konnten keine "abgegrenzten" Banden festgestellt werden. Lediglich Sojaseiweiß und Trockenblutplasma wurden im Gel in Fraktionen aufgetrennt, die sich jedoch nicht mit den Caseinfraktionen decken (Abb. 10).

Obwohl der mittlere Peak des Densitogrammes von Trockenblutplasma-Lösung fast im Bereich des β -Caseins liegt, kann durch das Auftreten eines zusätzlichen Peaks zu Beginn der Auftrennung sowie durch das Nichtübereinstimmen des dritten Peaks der Trockenblutplasma-Lösung mit dem α_1 -Casein eine deutliche Abgrenzung zum Casein erfolgen.

2.3.4. Vergleich zwischen Trockenblutplasma, Sojaseiweiß und Weizenkleber, jeweils in Kombination mit aufgeschlossenem Milcheiweiß

Um die eventuelle Beeinflussung der Elektrophorese für den Nachweis von aME abzuklären, wurden in einem weiteren Versuchsansatz Trockenblutplasma, Sojaseiweiß und Weizenkleber zu jeweils gleichen Gewichtsanteilen mit aME in Lösung gebracht und der Elektrophorese unterzogen. Diese Lösungen wurden 15 Minuten auf 70°C bzw. 120°C erhitzt. Die Untersuchungsergebnisse sind in den Abb. 11 und 12 dargestellt.

Wie Abb. 11 zeigt, wird der Nachweis von aME in den auf 70°C erhitzten Lösungen, die neben 0,5% aME auch 0,5% Trockenblutplasma enthielten, nicht störend beeinflusst. Gegenüber reiner aME-Lösung ist besonders eine für Trockenblutplasma typische, zusätzliche Bande festzustellen. Dagegen sind die aME/Weizenkleber-Densitogramme sowie die aME/Sojaseiweiß-Densitogramme weitgehend identisch (α -Casein- und β -Casein-Banden jeweils deckungsgleich) mit denen reiner aME-Lösung.

Abb. 11: Vergleich zwischen auf 70°C erhitzten aME-, aME/Trockenblutplasma- sowie aME/Sojaeiweiß-Lösungen (je 0,5%)

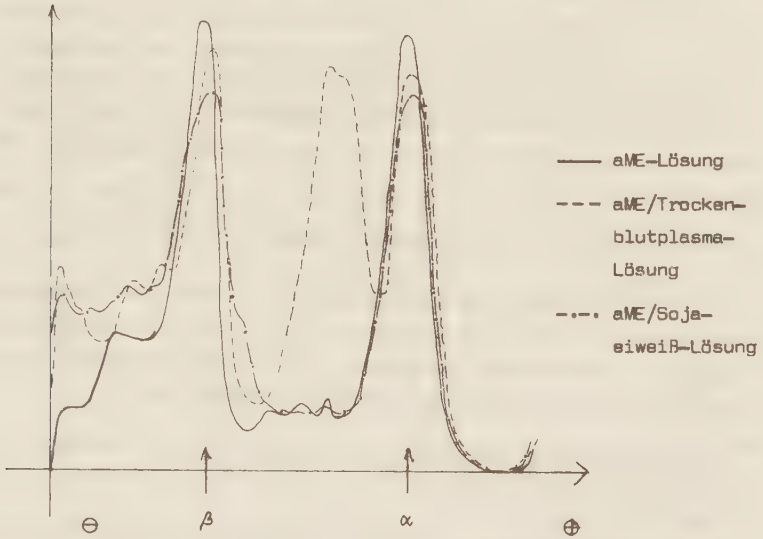


Abb. 12: Vergleich zwischen auf 120°C erhitzten aME (1%)-, aME/Trockenblutplasma (0,5%)- sowie aME/Sojaeiweiß (0,5%)-Lösungen

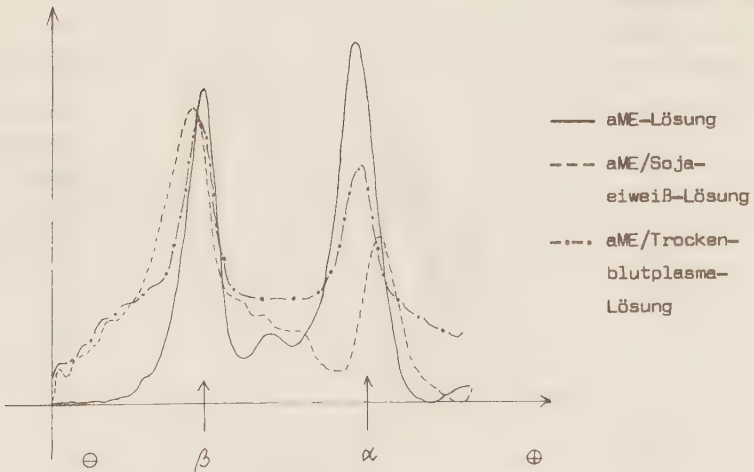


Abb. 12 zeigt die Untersuchungsergebnisse der bis auf 120°C erhitzten kombinierten Lösungen.

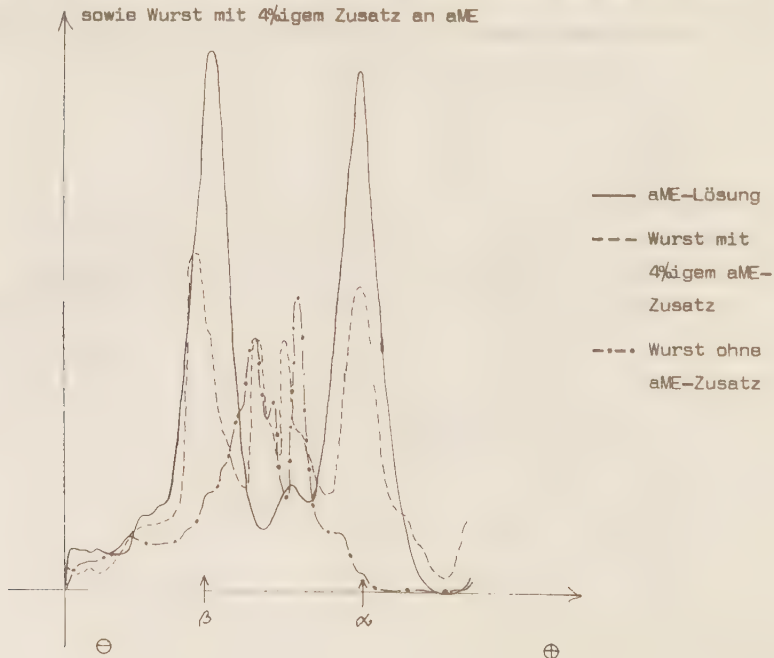
Wie aus den dargestellten Densitogrammen ersichtlich ist, traten sowohl in der aME/Trockenblutplasma-Lösung als auch in der aME/Soja-eiweiß-Lösung nur die für α - und β -Casein typischen Banden auf. Das Fehlen des für Trockenblutplasma und Sojaprotein spezifischen Bandenmusters ist vermutlich mit der Denaturierung dieser Eiweißfraktionen zu erklären.

2.3.5. Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Modellchargen

Für die Beweisführung, daß die Extrakte aus Wurstwaren mit bekanntem aME-Gehalt neben den Fleischiweißbanden auch die für α - und β -Casein spezifischen Bandenmuster aufweisen, wurden außerdem Wurstextrakte aus aME-freien Chargen sowie reine aME-Lösungen aufgetragen.

Die zur Untersuchung verwendeten Modellchargen sind in Tabelle 3 (siehe S. 32) zusammengestellt.

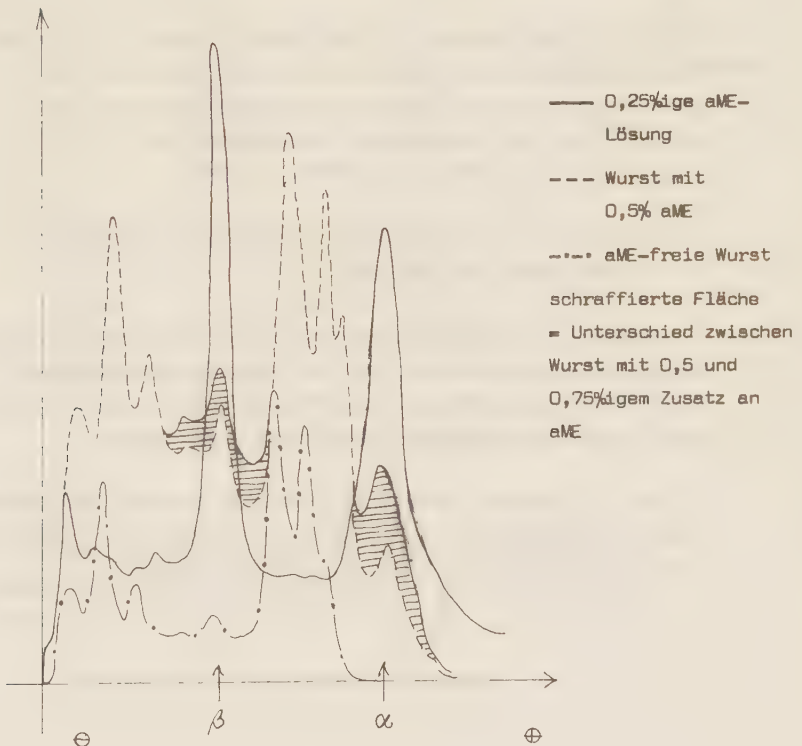
Abb. 13: Vergleich zwischen aME-Zusatz freier Wurst und aME in Lösung sowie Wurst mit 4%igem Zusatz an aME



Wie Abb. 13 deutlich zeigt, können die zwei im Densitogramm aus dem Extrakt der aME-haltigen Wurst zusätzlich zu den Fleischeiweiß-Banden erscheinenden Banden einwandfrei der α - bzw. β -Fraktion der aME-Lösung zugeordnet werden.

In einer weiteren Versuchsanordnung wurde geprüft, ab welcher Konzentration aME sicher nachgewiesen werden kann. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.

Abb. 14: Vergleich zwischen aME-freier Wurst sowie Wurst mit einem 0,5- und 0,75%igen Zusatz an aME und einer 0,25%igen aME-Lösung



Auf die Darstellung des ganzen Densitogrammes von Wurst mit 0,75% aME-Zusatz wurde im Interesse der Übersichtlichkeit verzichtet, da der Kurvenverlauf bis auf die in der Abb. 14 gezeigte Erhöhung der α - und β -Casein-Peaks identisch war.

Nachdem für den Nachweis von aME das Vorhandensein von beiden Casein-Banden (α - und β -Fraktion) entscheidend ist, kann das Ergebnis dann als positiv gewertet werden, wenn im Densitogramm der zu untersuchenden Wurst gegenüber der Kontrolle zwei zusätzliche Peaks auftreten, die anhand der aME-Lösung dem α - und dem β -Casein eindeutig zugeordnet werden können.

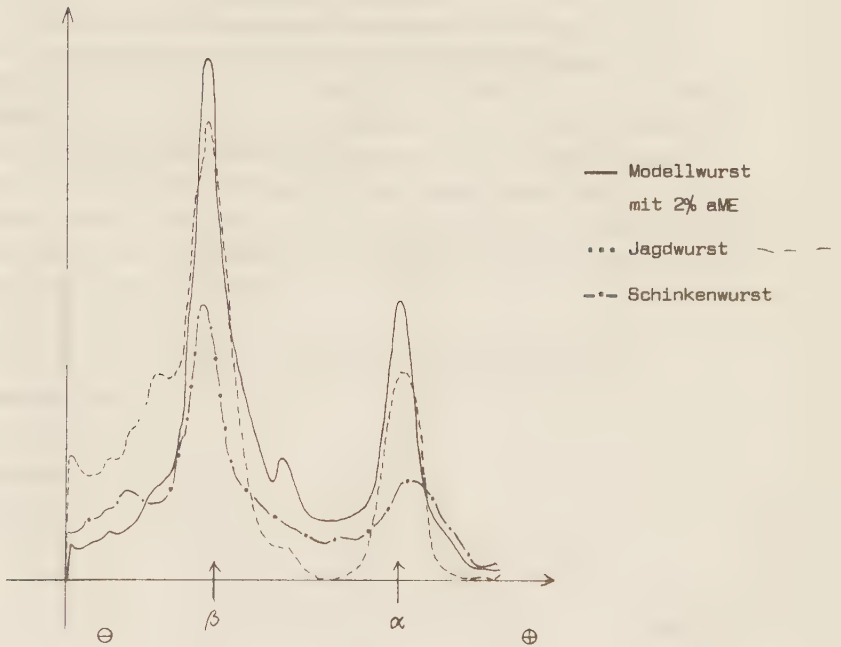
Aus Abb. 14 ist zu ersehen, daß die Kurve der Wurst mit 0,5% aME die beiden Casein-Banden aufweist. Bei einem Zusatz von weniger als 0,5% war kein positives Ergebnis zu erzielen. Ebenso war in auf 120°C erhitzten Modellchargen der Nachweis erst ab einer Konzentration von 0,5% mit Sicherheit zu führen.

2.3.6. Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleisch- erzeugnissen aus dem Handel

Der Nachweis von aME in hocheerhitzten Fleischerzeugnissen mit deklarisiertem Milcheiweißzusatz aus dem Handel wurde vergleichend mit Modellchargen geführt, deren aME-Gehalt bekannt war. aME konnte dabei in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden.

Für Abb. 15 wurde als Beispiel der Vergleich zwischen einer Modellcharge mit einem Zusatz von 2% aME und einer Jagdwurst-Konserve sowie einer Schinkenwurst-Konserve aus dem Handel gewählt.

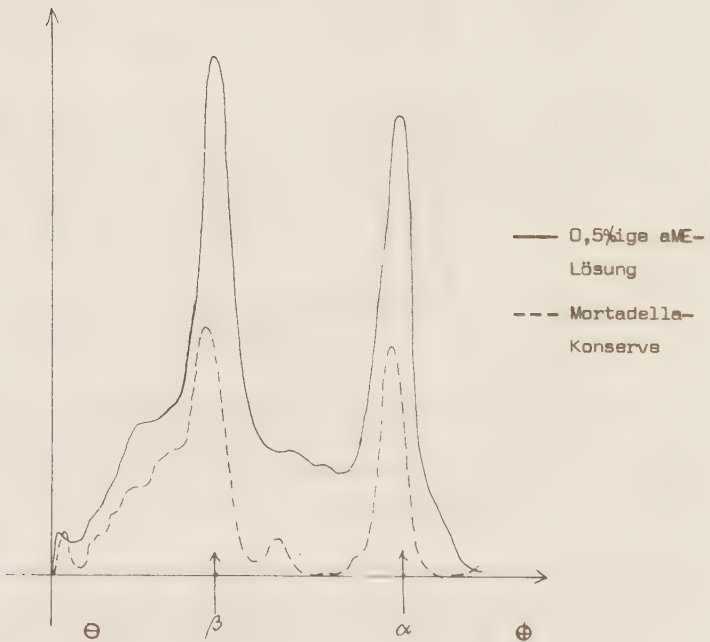
Abb. 15: Vergleich zwischen einer Modellcharge mit einem 2%igen aME-Zusatz und zwei Wurstkonserven aus dem Handel



Der Nachweis von aME in den beiden aus dem Handel bezogenen Wurstkonserven wird durch das Auftreten der - und -Casein-Banden geführt.

Zur Beweisführung, daß die auftretenden Banden den Hauptfraktionen des Caseins zuzuordnen sind, zeigt Abb. 16 den Aufschluß reiner aME-Lösung (0,5%ig) vergleichend mit dem Extrakt einer Mortadella-Konserve aus dem Handel.

Abb. 16: Vergleich zwischen einer 0,5%igen aME-Lösung und dem Extrakt aus einer Mortadella-Konserve aus dem Handel

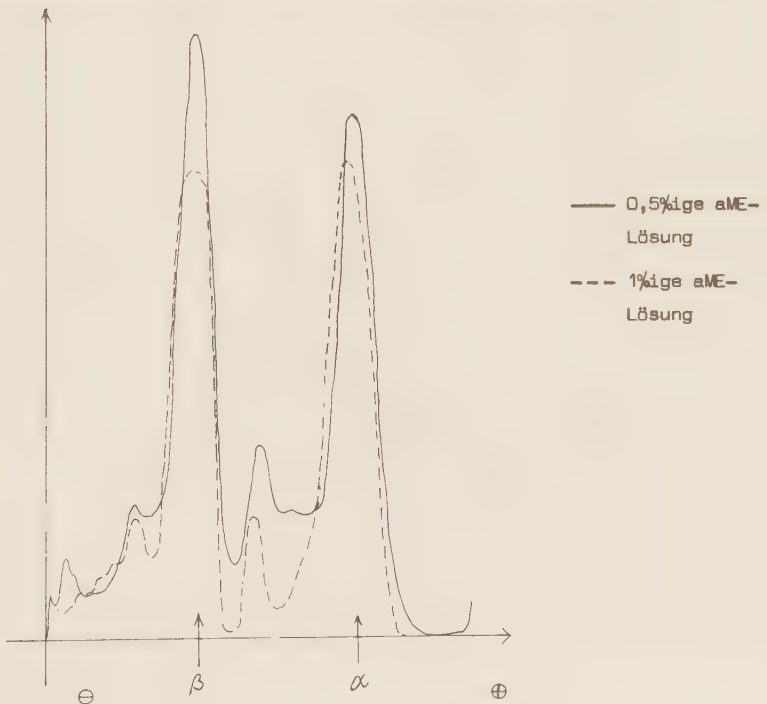


2.3.7. Versuch des quantitativen Nachweises von aufgeschlossenem Milcheiweiß

Für den Versuch, aME quantitativ nachzuweisen, wurden Lösungen von Casein sowie einem aME-Präparat unterschiedlicher Konzentration (0,5, 0,75, 1,0, 1,5 und 2,0%) hergestellt.

Aufgrund der schwankenden Untersuchungsergebnisse war der eindeutige quantitative Nachweis von aME nicht möglich. Wie z.B. Abb. 17 verdeutlicht, zeigten die Densitogramme einer 0,5%igen im Vergleich mit einer 1%igen aME-Lösung ein paradoxes Bild. Bei der 0,5%igen Lösung waren die α - und β -Caseinbanden stärker ausgeprägt als bei der 1%igen Lösung. Zwar waren diese Densitogramme nicht ständig zu erhalten, jedoch war die Erscheinung so häufig, daß m.E. eine quantitative Aussage nicht möglich ist.

Abb. 17: Vergleich zwischen 0,5%iger und 1%iger aME-Lösung



Auch die Untersuchungen der Modellchargen mit unterschiedlichen aME-Zusätzen ließen wiederholt Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen erkennen; diese waren jedoch nicht immer reproduzierbar. So zeigt z.B. Abb. 18 den Vergleich zwischen den Extrakten aus Wurst mit einem 2%igen sowie einem 3%igen aME-Zusatz. Die Abbildung verdeutlicht, daß sich ein quantitativer Nachweis nicht ableiten läßt.

Abb. 18: Vergleich zwischen Modellwurstchargen mit 2% und 3% aME-Zusatz

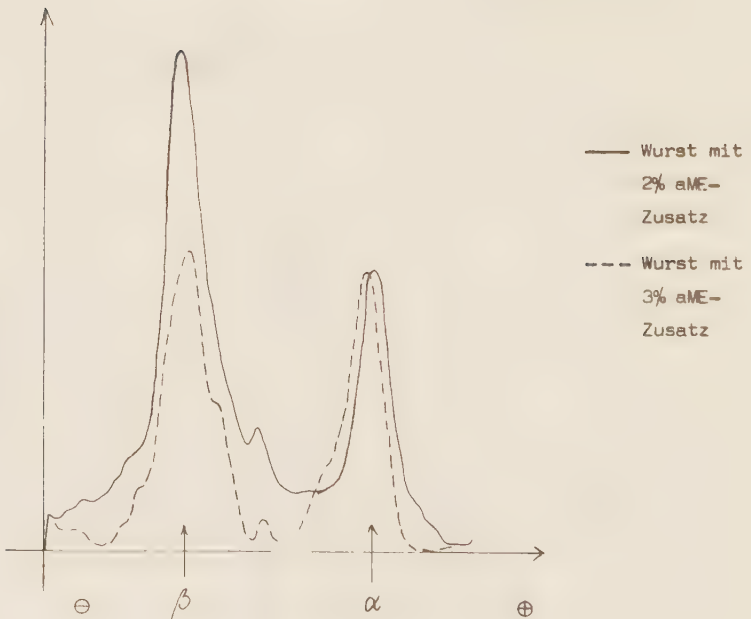
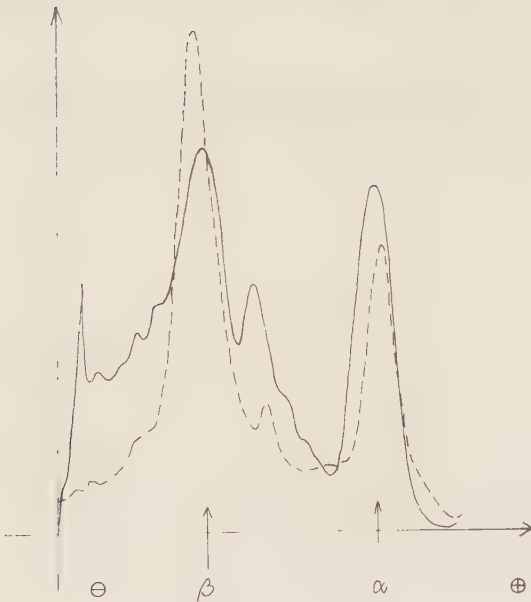


Abb. 19 unterstreicht diese Untersuchungsergebnisse. Beim Vergleich zweier Modellchargen, die zwar mit gleichem aME-Zusatz (2%) und nach gleicher Rezeptur, jedoch nicht am gleichen Tag angefertigt wurden, zeigt sich, daß die beiden Peaks der Densitogramme nicht nur absolut, sondern auch jeweils in Relation zueinander verschieden hoch sind.

Abb. 19: Vergleich zwischen zwei verschiedenen Modellchargen mit dem gleichen aME-Gehalt (2%)



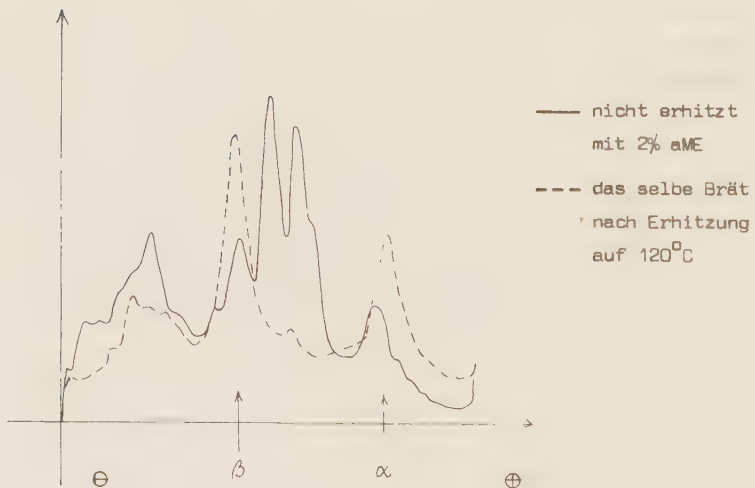
2.3.8. Beeinflussung des aufgeschlossenen Milcheiweiß-Nachweises in Fleischwaren durch Erhitzung

Voruntersuchungen mit Lösungen eines aME-Präparates, die auf 120°C erhitzt worden waren, ergaben keine Unterschiede gegenüber den auf 70°C erhitzten Lösungen.

Die Untersuchungen von Modellwurstchargen mit bekannten aME-Gehalten, die Kerntemperaturen von 70°C und 120°C für 15 Minuten ausgesetzt bzw. nicht erhitzt worden waren, zeigten, daß mit steigendem Temperatureinfluß die Ergebnisse deutlicher wurden.

Wie aus Abb. 20 ersichtlich ist, erscheinen im Vergleich zum nicht erhitzten bei bis auf 120°C erhitzten Brät im Gel nur die Banden von α - und β -Casein. Außerdem scheinen sich nach der Erhitzung die Casein-Banden intensiver darzustellen.

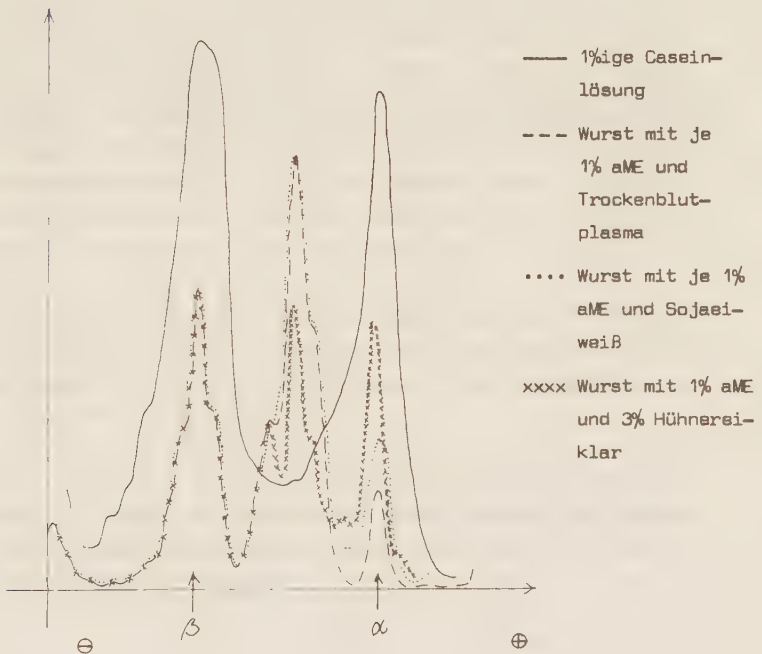
Abb. 20: Vergleich zwischen unerhitztem Wurstbrät mit 2% aME-Zusatz und Wurst aus dem selben Brät nach Erhitzung auf 120°C



2.3.9. Beeinflussung des aufgeschlossenen Milcheiweiß-Nachweises in Fleischerzeugnissen durch andere Fremdeiweiß-Zusätze

Wie Abb. 21 zeigt, beeinflusst die zusätzliche Verwendung von Trockenblutplasma, Sojaeiweiß und Hühnereiklar den Nachweis von aME in Fleischerzeugnissen nicht in signifikanter Weise.

Abb. 21: Vergleich zwischen Modellwurstchargen mit 1%igem aME-Zusatz in Kombination mit 1% Trockenblutplasma, 1% Sojaeiweiß bzw. 3% Hühnereiklar



Außerdem zeigt sich, daß die Extinktion der β -Casein-Banden bei den untersuchten Fremdeiweiß-Kombinationen gleich ist. Zwar ist die α -Casein-Bande ebenfalls in allen Kombinationen deutlich erkennbar, jedoch verschieden stark ausgeprägt.

2.3.10. Untersuchung von lyophilisiertem Wurstgut ohne vorherige Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß

Um den Zeitaufwand bei der Anwendung dieser Methode für Routineuntersuchungen zu verkürzen, wurde versucht, lyophilisiertes Wurstgut für die Auftrennung direkt in die Geltaschen einzubringen. Zum Auftragen der Proben wurde ein Micro-Pelletizer verwendet, der das aME-haltige Lyophilisat in "Pellets" mit 0,5 Millimeter Durchmesser formte. Die in die Geltaschen verbrachten Pellets wurden jedoch nicht in Caseinbanden aufgetrennt, sondern zeigten im Gel eine durchgehende, intensiv gefärbte Spur. Eine Zuordnung zu den spezifischen α - und β -Caseinbanden war daher nicht möglich.

D. DISKUSION

In der Lebensmittelüberwachung sind bislang zur Fremdeiweißbestimmung chemische und vor allem serologische Methoden gebräuchlich.

Der serologische Nachweis von Mischelweiß in Fleischerzeugnissen in Reaktionsversuchungen wird hauptsächlich über die Bestimmung des Immunitätsanteils des Serums, der abgesaugt und quantitativ erfährt wird, geführt (7, 59, 96, 97).

Für den qualitativen Nachweis von aME hat von den serologischen Methoden die Bechettung die größte Anwendung gefunden (14, 32, 92, 103, 104). Für den quantitativen Nachweis hat sich vor allem die Immunelektrophorese (14, 35, 36, 49, 89, 90), sowie die indirekte Hämagglutination (31, 53, 56, 91) durchgesetzt.

Serologische Untersuchungsmethoden, vor allem für Routineuntersuchungen, sind als serologische Reaktionen grundsätzlich mit Fehlern behaftet. In der Lebensmittelüberwachung beginnt die Schwierigkeit bereits bei der Herstellung spezifischer Antiseren sowie bei der Gewinnung der Antigene aus den Fleischerzeugnissen (35, 36, 77, 89).

Trotz aller Bemühungen zur Überstandardisierung der serologischen Nachweismethoden (24, 34, 35, 36, 89) bleibt doch die allen biologischen Reaktionen inhärente Unsicherheit bestehen. Je nach Methode beträgt der relative Fehler 2 bis 10%.

Aufgrund der Nachteile der serologischen und chemischen Untersuchungsverfahren ist vielfach bereits versucht worden, speziell für den Nachweis von aME in Fleischerzeugnissen, die Elektrophorese mit verschiedenem Trägermaterial zu verwenden.

VAN BAAL und LEGET (3) benutzen zum Nachweis von aME die Papier-elektrophorese. OLSMAN (69) konnte mit Hilfe der Harnstoff-Stärke-gel-Elektrophorese aus bis zu 115°C erhitzten Fleischerzeugnissen aME ab einem Zusatz von 0,25% nachweisen. Dabei soll mit Vergleichs-proben eine grob quantitative Schätzung des aME-Gehaltes möglich sein. Ab einem Zusatz von 0,1% können VAN GILS und HIOSKES (21) mittels der Celluloseacetat-Folien-Elektrophorese aME in Fleischerzeugnissen nach-weisen. Durch Densitometrie der gefärbten Folien soll außerdem eine quantitative Bestimmung des aME-Zusatzes möglich sein, wobei es sich allerdings um ein arbeitsaufwendiges Verfahren handelt.

Die Schwierigkeit, aME möglichst vollständig aus den Fleischerzeug-nissen zu extrahieren bzw. rein darzustellen (3, 21), tritt bei der Elektrophorese in den Vordergrund.

FREIMUTH und KRAUSE (18) benützten erstmals Polyacrylamidgel als Trägermaterial für den elektrophoretischen Nachweis von aME in Fleisch-erzeugnissen. Sie konnten damit den Nachweis optimal gestalten und be-richten über die Möglichkeit der halbquantitativen Auswertung.

SPELL (95) konnte mit Polyacrylamidgel als Trägersubstanz "weniger als 2% aME" in Fleischerzeugnissen, die bis auf 120°C erhitzt worden waren, spezifisch nachweisen.

HOFMANN und PENNY (40) können mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese den Anteil an Fremdeiweißen, d.h. auch aME, sogar nach hoher Erhitzung der Fleischerzeugnisse quantitativ bestimmen.

Die Vorteile, die Polyacrylamidgel gegenüber anderen Trägersubstanzen in der Elektrophorese bietet, lassen sich nach MAURER (64) wie folgt zusammenfassen:

"Chemische Stabilität und Inaktivität; Transparenz; die Möglichkeit, verschiedene Porengrößen herzustellen; das Fehlen von Adsorption und

Elektro-Osmose; Stabilität gegenüber pH-Wert- und Temperatur-Änderungen; Unlöslichkeit in den meisten Lösungsmitteln; die analytische Reinheit der Komponenten sowie die gute Reproduzierbarkeit der Herstellung der Gele."

Nach PETERSON (106) ist mit Hilfe des Polyacrylamidgels gegenüber Papier und Stärkegel eine bessere Auftrennung der zu untersuchenden Stoffe möglich. Gegenüber Stärkegel ist Polyacrylamidgel leichter und schneller zu bereiten und "verträgt" höhere Spannungen. Somit können die Auftrennungszeiten erheblich verkürzt werden.

In den eigenen Untersuchungen wurde zur Extraktion von aME aus Fleisch-erzeugnissen der Tris-Borsäure-Elektrodenpuffer verwendet, da er aufgrund seines alkalischen pH-Wertes zur Extraktion von aME gut geeignet schien. Durch derart gewonnene Extrakte sollte außerdem vermieden werden, daß zusätzlich fremde Ionen, wie z.B. Chloridionen bei Verwendung von Kochsalzlösung zur Extraktion, in das System eingebracht werden, die möglicherweise die Elektrophorese beeinträchtigen können.

Die sich bei der Untersuchung der aME-Präparate stets darstellenden charakteristischen Banden wurden, wie in der Literatur beschrieben (3, 18, 19, 95), durch den direkten Vergleich mit reinem Casein als Fraktionen des Caseins identifiziert.

Nachdem das Casein durchschnittlich zu 75% aus α -Casein und zu 22% aus β -Casein besteht (38), wäre zu erwarten, daß sich die aufgrund der höheren elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit dem α -Casein zuzuordnende Bande kontinuierlich stärker darstellt als die β -Casein-Bande. Wie aus den Abb. 1 - 6 deutlich wird, stellen sich zwar in jedem Falle die beiden Casein-Banden dar, weisen aber in ihrer Intensität beträchtliche Schwankungen auf. Selbst bei Auftrennung von reinem Casein fielen die Unterschiede in der Aufteilung der α - und β -Fraktion auf. Diese Beobachtung ist m.E. möglicherweise auf die von PICKARDT (77) beschriebenen Unterschiede in der Löslichkeit zwischen den einzelnen aME-Präparaten

zurückzuführen. Auf der unterschiedlichen Löslichkeit des Caseinats an sich könnten dann auch die deutlichen Schwankungen zwischen α - und β -Casein beruhen. Daß bei allen untersuchten aME-Präparaten zwar die Lokalisation der Casein-Banden gleich war und nur ihre Intensität von Präparat zu Präparat differierte, könnte möglicherweise auch auf die unterschiedlichen Herstellungsverfahren der einzelnen Präparate zurückzuführen sein. Die Veränderung in der Intensität des Bandenbildes könnte außerdem durch die Verwendung unterschiedlich gewonnener Ausgangsmaterialien bzw. deren Behandlung oder Beschaffenheit bedingt sein.

Wie auch VAN BAAL und LEGET (3) bei Untersuchungen mittels der Papier-Elektrophorese festgestellt haben, hat eine "Behandlung" des Caseins keinen Einfluß auf das elektrophoretische Bild. Der Nachweis der für α - und β -Casein typischen Banden-Lokalisation war in allen aME-Lösungen eindeutig zu führen.

Von den untersuchten eiweißhaltigen Wurstzusatzmitteln konnten nur bei Trockenblutplasma und Sojaseiweiß mit der hier angewendeten Methode zusätzliche Banden beobachtet werden. Da die aufgeführten Stoffe (2.1.2.) mit Ausnahme von Trockenblutplasma und Sojaseiweiß bereits in Lösung nicht nachzuweisen waren, wurde in den weiteren Untersuchungen davon ausgegangen, daß sie in Extrakten aus Wurstwaren nicht nachzuweisen sein würden und somit den Nachweis von aME nicht stören.

In bis auf 70°C und 120°C erhitzten Lösungen aus je 0,5% aME und Sojaseiweiß konnte im Gegensatz zu SPELL (95) nur aME nachgewiesen werden. Die spezifischen Banden für Sojaseiweiß, wie sie SPELL (95) mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese erhielt, traten nicht auf (Abb. 11). Der Nachweis von aME wurde durch Sojaseiweiß nicht beeinträchtigt.

Bei Lösungen, die neben 0,5% aME noch 0,5% Trockenblutplasma enthielten, ergaben sich noch nach Erhitzung auf 70°C zusätzliche, durch

des Blutplasma-Eiweiß hervorgerufene Banden. Die für Casein typische Banden-Lokalisation blieb jedoch erhalten, so daß aME eindeutig zu identifizieren war.

In auf 120°C erhitzten aME/Trockenblutplasma-Lösungen konnte nur noch aME nachgewiesen werden (Abb. 12).

Weder die kombinierte Verarbeitung mit anderen Eiweißpräparaten noch Erhitzung auf 120°C haben die qualitative Erfassung des aME in Lösungen beeinflusst.

Der Nachweis von aME in Fleischerzeugnissen konnte aufgrund der für aME spezifischen Bandenlokalisation von α - und β -Casein ab einem Zusatz von 0,5% eindeutig geführt werden. Dabei zeigte sich, daß die Farbintensität der Caseinbanden der Extrakte aus den bis auf 120°C erhitzten Fleischerzeugnissen gegenüber denen der bis auf 70°C erhitzten stärker war. Die Beobachtung, daß sich das aus hocherhitzten Fleischerzeugnissen extrahierte aME deutlicher darstellen läßt, als das aus bis auf 70°C erhitzten extrahierte, kann mit der völligen Hitzedenaturierung der Fleisch-Eiweiße erklärt werden. Nach SINELL (89a) verringert sich der Gesamteiweißgehalt der Extrakte aus einer Brühwurst mit steigender Erhitzung weitgehend umgekehrt proportional zur Höhe des zugesetzten Fremdeiweißanteils. Dieses "Verhältnis" hilft das relative Ansteigen der Casein-Peaks im Densitogramm zu erklären.

Nach SINELL und KLUGE-WILM (90) kann, wie auch aufgrund der eigenen Untersuchungsergebnisse, vermutet werden, daß in einem Muskel-Milcheiweiß-Extrakt aus hocherhitztem Brühwurstmaterial ein zumindest relativ höherer Anteil an Milcheiweißkörpern enthalten ist, als in einem Extrakt aus dem gleichen, aber nicht so hoch erhitzten Material.

Nachdem der Nachweis von aME eindeutig zu führen war, wurde versucht, das Milcheiweiß in den Fleischerzeugnissen auch quantitativ zu bestimmen.

Nach HOFMANN und PENNY (40) ist der Nachweis von Fremdeiweißen mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese auf Flachgelen möglich. Auch LOTZ und Mitarb. (62) berichten über den quantitativen Nachweis von aME in Fleischerzeugnissen mittels der Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese.

Nach FREIMUTH und KRAUSE (19) ist jedoch durch densitometrische Auswertung der Gele nur ein semiquantitativer Nachweis möglich. Eine beträchtliche Fehlerquelle im Hinblick auf eine quantitative Auswertung stellt nach HOFMANN und PENNY (40) die elektrophoretische Entfärbung, die auch den an Proteine gebundenen Farbstoff zum Teil wieder herauslösen kann, dar. SINELL (89) hält in Fleischerzeugnissen eine "wenigstens angenähert quantitative Bestimmung" von aME dann für möglich, wenn Vergleichsmaterial zur Verfügung steht, das dem Untersuchungsmaterial hinsichtlich Herstellung und Zusammensetzung und vor allem in der Erhitzung weitgehend entspricht. Ein entsprechender Vergleich mit aME-Lösungen ist für eine quantitative Aussage nicht ausreichend.

Die in Abb. 19 dargestellten Ergebnisse unterstreichen die Ausführungen SINELLs. Zwar wurden beide Modellchargen nach der gleichen Rezeptur hergestellt, jedoch an verschiedenen Tagen.

Nachdem bereits gleich hohe Konzentrationen von verschiedenen aME-Präparaten in Lösungen in ihren Densitogrammen unterschiedliche Peak-Höhen aufwiesen und auch die Relation der Peaks zueinander schwankte, scheidet ein quantitativer Nachweis mittels der hier beschriebenen Methode aus. Da eine große Anzahl verschiedener aME-Präparate in Fleischerzeugnissen Anwendung finden kann, kommt noch die von VON PICKARDT (77) beschriebene recht unterschiedliche Löslichkeit

und damit verbundene Extrahierbarkeit der einzelnen aME-Präparate als weiterer Unsicherheitsfaktor hinzu.

Selbst grobe Schätzungen über die Menge des aME-Zusatzes im Fleisch-erzeugnis dürften vage sein.

Der besondere Vorzug der beschriebenen Methode liegt in dem spezifischen Nachweis von aME in Konzentrationen ab 0,5% auch in hoch-erhitzten Fleischerzeugnissen. Ein weiterer Vorteil besteht in der relativ leichten Durchführbarkeit. Außerdem können größere Proben-mengen (je nach Modell der Elektrophoresevorrichtung bis zu 20 Proben pro Ansatz) gleichzeitig untersucht werden.

Gegenüber den bisher für den Nachweis von Fremdeiweißen in Fleisch-erzeugnissen Anwendung findenden serologischen Methoden ist dieses Verfahren mit geringeren Fehlerquellen, bezogen auf die Spezifität des Nachweises, behaftet. Die möglichen Unsicherheiten serologischer Nachweisreaktionen, die durch die Qualität der Antiseren sowie der Extrakte und durch die Wahl der Reaktionsmethode hervorgerufen werden können, sind ausgeschlossen.

In vielen Fällen ist bereits nach erfolgter Färbung mit dem bloßen Auge aufgrund der spezifischen α - und β -Casein-Banden eine Aussage möglich.

Die Möglichkeit, die Gele in 10%iger Essigsäure, auch eingeschweißt in Plastikfolie, aufzubewahren (40), sowie die Möglichkeit der gra-phischen Darstellung mittels Densitometer sind Vorteile für die Dokumentation.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Literatur über die gesetzlichen Bestimmungen zur Verarbeitung von aME in Fleischerzeugnissen, über die technologische und diätetische Bedeutung des aME, seine chemisch-physikalischen Eigenschaften sowie verschiedene Extraktions- und Nachweisverfahren wird besprochen. Außerdem wird die Literatur über Elektrophorese, speziell über die Polyacrylamidgel-Elektrophorese, erörtert.

Aufgrund der Ergebnisse aus Vorversuchen wurden die Hauptversuche mit einem dreischichtigen Trenngel bei kontinuierlichem pH-Wert (9,0) mit einer Stromstärke von 50 mA durchgeführt.

17 aME-Präparate wurden untersucht. Sie verhielten sich in der Elektrophorese grundsätzlich wie Casein. Die dabei auftretenden Banden waren eindeutig der α - und β -Fraktion des Caseins zuzuordnen.

Verschiedene Wurstzusatzmittel wurden im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung des aME-Nachweises untersucht. Eine Beeinträchtigung des Nachweises von aME war nicht festzustellen.

Auf 70 und 120°C erhitzte Brühwurst-Modellchargen mit aME-Zusätzen von 0,5 bis 5%, auch in Kombination mit Trockenblutplasma, Sojaseiweiß und Hühnereiklar, wurden untersucht. Der spezifische Nachweis von aME konnte ab einer Konzentration von 0,5% eindeutig geführt werden. In hocherhitztem Untersuchungsmaterial war durch eine "relative Verstärkung" der Caseinbanden der Nachweis von aME besonders deutlich zu führen.

Der Versuch, in lyophilisiertem Wurstgut ohne vorherige Extraktion aME nachzuweisen, erbrachte keine brauchbaren Ergebnisse.

Eine quantitative Bestimmung von aME-Zusätzen ist mit der hier beschriebenen Methode nicht möglich. Auch eine semiquantitative Auswertung erscheint nicht durchführbar.

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese ist wegen der festgestellten Spezifität und der einfachen Durchführbarkeit für den qualitativen Nachweis von aME vor allem in hocherhitzten Brühwurstzeugnissen in der Routineuntersuchung gut geeignet.

SUMMARY

The literature on regulations for processing of disintegrated milk protein in meat products, on the technological and dietetic importance of disintegrated milk protein, its chemical-physical properties as well as different procedures for its extraction and detection is reported. Moreover the literature on electrophoresis in general as well as on polyacrylamid-gel-electrophoresis in special is discussed.

Basing on the results of preliminary experiments investigations with a three-layered separation-gel at a continuous pH-value (9.0) and with a current of 50 mA were performed.

17 different samples of disintegrated milk protein tested in this way reacted in electrophoresis principally in the same manner as casein. Unequivocally the appearing bands were to coordinate to the α - and β -fractions of casein. The determination of disintegrated milk protein was not influenced by different additives for sausages.

Model-charges of cooked sausage with 0.5 to 5.0% of disintegrated milk protein, also in combination with dried blood plasma, soy protein, and egg-white respectively, heated up to 70 and 120°C, were tested.

Disintegrated milk protein could already be detected in concentrations of 0.5%. High temperatures (120°C) favoured the detection of disintegrated milk protein in sausage.

The attempt of detecting disintegrated milk protein in lyophilised sausages without preliminary extraction failed.

The quantitative determination of disintegrated milk protein in meat products with the above described method is not possible. Even a semiquantitative evaluation seems not to be practicable.

According to the performed investigations the polyacrylamid-gel-electrophoresis is suitable for the qualitative detection of disintegrated milk protein - particularly in high-heated cooked sausages - in routine examination.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allen, R.C.: Ortec Life Sci. 1, No. 1 (1969).
zit. nach: Maurer, H. R. (64)
2. Antweiler, H.J.: In: Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie.
Bd. III/2
Gg. Thieme Verlag, Stuttgart, 1955, S. 214
3. Baal, J.P.W. van und J.N. Leget: Nachweis von Casein und Na-Caseinat
in Fleischprodukten.
Z. Lebensmitt.-Untersuch. 127 (1965), 263
4. Belitz, H.D. und J. Schormüller: Aminosäuren, Peptide, Proteine und
andere Stickstoffverbindungen.
In: Handbuch der Lebensmittelchemie. Bd. I,
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965, S. 167
5. Blix, G., K. Felix, W. Grassmann und J. Trupke: Eiweißstoffe und
ihre Abbaustufen.
In: Physiologische Chemie; Lehr- und Handbuch für Ärzte,
Biologen und Chemiker. Bd. I,
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1951, S. 584
6. Brattsten, I.: Arkiv för Kemi 8 (1955), 205.
zit. nach: Maurer, H.R. (63)
7. Braun, G.: Bemerkungen zur Milcheiweißbestimmung in Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensmitt.-Untersuch. 129 (1965/66), 160
8. Brendl, J. und S. Klein: Der Einfluß von Milcheiweißzusätzen auf das
Wasserbindungsvermögen des Fleisches.
Fleischwirtschaft 52 (1972), 334

9. Brunner, J.R., C.A. Ernstrom und R.A. Hollis: Nomenclature of the proteins of bovine milk - first revision.
J. Dairy Sci. 43 (1960), 901
10. Davis, B.J.: Disc-electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964), 404
11. Degenkolb, E. und M. Hingerle: Untersuchungen über den serologischen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen.
Arch. Lebensmittelhyg. 18 (1967), 241
12. Degenkolb, E. und M. Hingerle: Eine serologische Schnellmethode zum quantitativen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in hitze-denaturierten Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 73
13. Dittmer, A.: Chemie und Aufbau des Eiweißes.
In: Plasmasiweiß und Elektrophorese, 3. Aufl.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1965, S. 5
14. Enoch, Ch.: Zur biologischen Differenzierung von hocherhitzten Fleischwaren. Vergleichende Untersuchungen mittels Agar-Gel-Diffusion, Immunelektrophorese und indirekter Hämagglutination.
Diss. med. vet. München 1967
15. Fleischverordnung in der Fassung vom 6. Juni 1973
(BGBI. I, S. 553)
16. Forsbach, E.: Über aktuelle Fragen des Lebensmittelrechts auf dem Gebiet der Fleischwirtschaft 13 (1962), 177

17. Freimuth, U. und W. Krause: Gelelektrophoretischer Nachweis von Kuhmilch in Frauenmilch.
Nahrung 11 (1967), 729
18. Freimuth, U. und W. Krause: Zum gelelektrophoretischen Nachweis von Fremdproteinen in Milch- und Fleischerzeugnissen (Referat).
Mitt. Bl. GDCh-Lebensmittelchemie und gerichtl. Chemie 22 (1968), 217
19. Freimuth, U. und W. Krause: Elektrophoretischer Nachweis von Bindemitteln auf Milcheiweißbasis in Fleischerzeugnissen.
Nahrung 13 (1969), 447
20. Gerigk, K. und H. Krüger: Untersuchungen zur Extraktion von Fremdeiweiß aus Fleischwaren.
Zbl. Vet. Med. B 19 (1972), 226
21. Gils, W.F. van und G.G. Hidskes: Detection of casein, soy proteins and coagulated egg-white in meat products by electrophoresis on cellulose acetate membranes.
Z. Lebensmitt.-Untersuch. 151 (1973), 175
22. Grabar, P. und C.A. Williams: Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimique d'un mélange des protéines. Application au sérum sanguin.
Biochim. Biophys. Acta 10 (1953), 193
23. Gross, D.: Electrophoresis in stabilizing media.
Analyst 90 (1965), 380
24. Günther, H.: Bestimmung von Fremdeiweiß in Fleischwaren.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 97

25. Günther, H.: Bestimmung von Fremdeiweiß in Fleischwaren.
Mitt. Bl. GDCh-Lebensmittelchemie und gerichtl. Chemie 23
(1969), 303
26. Hanson, L.^R: Immunological technique for the detection of milk
proteins in food products.
Nord. Vet.-Med. 16 (1964), 201
27. Haupt, H.: Erläuterungen zur Verordnung über Fleisch und Fleisch-
erzeugnisse (Fleisch-Verordnung) vom 19. Dezember 1959.
Arch. Lebensmittelhyg. 11 (1960), 1
28. Haurowitz, F.: Eiweißdenaturierung.
In: Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch-
und pathologisch-chemischen Analyse. Bd. IV/1,
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960, S. 116
29. Hellmann, E. und E. Quentin: Zum Nachweis der Verarbeitung von frischem
Hühnereiklar in Brühwürsten mit Hilfe der Präzipitations-
reaktion.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 81 (1968), 444
30. Herrmann, Ch.: Über den Nachweis von hitzedenaturiertem Hühnereiklar
in Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.
Diss. vet. med. München 1963
31. Herrmann, Ch.: Über die zugleich quantitative Differenzierung von er-
hitztem Eiweiß mittels der indirekten Hämagglutination.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 78 (1965), 370
32. Herrmann, Ch., D. Holpert und G. Pfeiffer: Zur serologischen Er-
fassung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in hocherhitzten
Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 17 (1966), 12

33. Herrmann, Ch. und L. Kotter: Serologische Verfahren bei der Überwachung von Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 265
34. Herrmann, Ch. und Ch. Merkle: Zur Standardisierung und Konservierung der sensibilisierten Hammelerythrozyten für die indirekte Hämagglutination zum Nachweis von Fremdeiweiß.
Arch. Lebensmittelhyg. 22 (1971), 189
35. Herrmann, Ch., Ch. Merkle und L. Kotter: Zur Problematik serologischer Nachweisreaktionen für Fremdeiweiße in erhitzten Fleischerzeugnissen. 1. Mitt.: Präzipitationsreaktionen.
Fleischwirtschaft 53 (1973), 97
36. Herrmann, Ch., Ch. Merkle und L. Kotter: Zur Problematik serologischer Nachweisreaktionen für Fremdeiweiße in erhitzten Fleischerzeugnissen. 2. Mitt.: Agglutinationsreaktionen.
Fleischwirtschaft 53 (1973), 249
37. Hipp, N.J., M.L. Groves, J.H. Custer und T.L. Mc. Meekin: Separation of γ -casein.
J. Am. Chem. Soc. 72 (1950), 4928
38. Hipp, N.J., M.L. Groves, J.H. Custer und T.L. Mc. Meekin: Separation of α -, β - and γ -casein.
J. Dairy Sci. 35 (1952), 272
39. Hjertén, S., S. Jerstedt und A. Tiselius: Electrophoretic "particle sieving" in Polyacrylamide gels as applied to ribosomes.
Anal. Biochem. 11 (1965), 219
40. Hofmann, K. und J.F. Penny: Eine Methode zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Fleisch- und Fremdeiweiß mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Flachgelen.
Fleischwirtschaft 53 (1973), 254

41. Holpert, D.: Zum histochemischen und immunhistochemischen Nachweis von Milcheiweiß in Brühwürsten.
Diss. med. vet. München 1965
42. Hoog, P. de, S.v.d. Reek und F. Brouwer: Nachweis und Bestimmung von aufgeschlossenem Milcheiweiß und Sojaprotein in Fleischerzeugnissen.
Fleischwirtschaft 50 (1970), 1663
43. Jenness, R. und S. Patton: Grundzüge der Milchchemie.
Bayr. Landwirtschaftsverlag, München-Basel-Wien 1967,
S. 119 und 133
44. Jübermann, O.: Verteilen und Extrahieren.
In: Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie. Bd. I/1,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1958, S. 223
45. Kasper, W.: Das "Warum" einer Emulsion.
Bayr. Metzgermeister, Nr. 17 vom 24. April 1971, S. 4
46. Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 5. Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1966, S. 47
47. McKenzie, H.A.: Milk proteins, chemistry and molecular biology. Vol. II,
Academic Press, New York-London 1971, S. 98
48. Kiermeier, F. und O. Kirchmeier: Quantitative elektrophoretische Analyse der Milchproteine.
Z. Lebensmitt.-Untersuch. 125 (1964), 341
49. Kluge-Wilm, R.: Serologischer Nachweis von Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischwaren.
Diss. med. vet. Berlin 1967

50. Kohlrausch, F.: Über Concentrationsverschiebungen durch Electrollyse im Inneren von Lösungen mit Lösungsgemischen.
Ann. Phys. Chem. 62 (1897), 209
51. Kolb, M.: Zur Untersuchung des Enzymmusters der Haut: Das Protein- und α -Naphthylacetat (Esterase)-Muster der Kopf-, Bauch- und Schienbeinhaut.
Diss. med. Heidelberg 1971
52. Kotter, L.: Serologische Methoden zur Untersuchung von Proteinen.
In: Handbuch der Lebensmittelchemie. Bd. II/2,
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965
53. Kotter, L., Ch. Herrmann und G. Corsico: Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.
Z. Lebensmitt.-Untersuch. 133 (1966), 15
54. Kotter, L., A. Palitzsch und Ch. Herrmann: Technologische Bedeutung von Fremdeiweiß bei der Fleischwarenverarbeitung,
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 261
55. Kotter, L. und O. Prändl: Chemisch-physikalische Vorgänge bei der Brühwurstfabrikation,
Arch. Lebensmittelhyg. 2 (1956), 219
56. Kotter, L., H. Schulze und Ch. Herrmann: Lebensmittelrechtliche Beurteilung von Fremdeiweißzusätzen zu Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 263
57. Kotter, L. und G. Terplan: Neue Erkenntnisse bei der Herstellung von Fleischwaren unter besonderer Berücksichtigung der verfügbaren und der zulassungsbedürftigen Zusatzstoffe.
Arch. Lebensmittelhyg. 12 (1961), 169

58. Kraack, J.: Bestimmung von Fremdeiweiß in Wurstwaren.
Fleischwirtschaft 53 (1973), 697
59. Kutscher, W., W. Nagel und W. Pfaff: Nachweis und quantitative Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensmitt.-Untersuch. 115 (1961), 117
60. Larson, B.L. und G.D. Roller: Heat denaturation of the specific serum proteins in milk.
J. Dairy Sci. 38 (1955), 351
61. Lerche, M.: Werden Würste, denen Trockenmagermilch und Nährcasein zugesetzt wurden, in ihrer Beschaffenheit und Haltbarkeit beeinflusst?
Z. Fleisch- und Milchhyg. XLVII (1937), 47
62. Lotz, R., Ch. Herrmann und P. Weigert: Milcheiweißnachweis in Fleisch-erzeugnissen mittels der Disk-Elektrophorese.
Arch. Lebensmittelhyg. 24 (1973), 47
63. Maurer, H.R.: Disk-Elektrophorese. 1. Aufl.
Walter de Gruyter Verlag, Berlin 1968
64. Maurer, H.R.: Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamid gel electrophoresis. 2. Aufl.
Walter de Gruyter Verlag, Berlin-New York 1971
65. Mellander, O.: Elektrophoretische Untersuchungen von Casein.
Biochem. Z. 300 (1939), 240
66. Montag, A.: Spektralphotometrische Bestimmung von Casein aus Fleisch-erzeugnissen.
Fleischwirtschaft 52 (1972), 1333

67. Nordal, J. und L. Rossebø: Enzymatic precipitation in agar gel as a method for the detection of sodium caseinate in raw and heated milk products.
Z. Lebensmitt.-Untersuch. 148 (1972), 65
68. Nüsse, K.: Lebensmittelrechtliche Verordnungen.
Verlag Carl Heymans KG., Berlin-Köln-München-Bonn 1961,
S. 107
69. Olsman, W.J., W.C.H. Houtepen und C. van Leeuwen: Elektrophoretischer Nachweis von fleischfremden Eiweißen in Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensmitt.-Untersuch. 141 (1969), 253
70. Ornstein, L.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964), 321
zit. nach: Maurer, H.R. (64)
71. Ouchterlony, Ö.: Diffusion in gel-methods for immunological analysis. I
Progr. Allergy 5 (1958), 1
72. Ouchterlony, Ö.: Diffusion in gel-methods for immunological analysis. II
Progr. Allergy 6 (1962), 30
73. Oudin, J.: La diffusion d'un antigène dans une colonne de gel contenant les anticorps précipitants homologues. Etude quantitative des trois principales variables.
Comptes rend. Acad. Sci. 228 (1949), 1890
74. Ott, H.: Prot. Biol. Fluids 10 (1963), 305
zit. nach: Maurer, H.R. (64)
75. Pfaff, W.: Die Definition "aufgeschlossenes Milcheiweiß" im Wandel der Fleischverordnungen.
Fleischwirtschaft 54 (1974), 46

76. Pfaff, W.: Aufgeschlossenes Milcheiweiß für Brühwurst.
Fleischwirtschaft 54 (1974), 47
77. Pickardt, E. von: Zur Standardisierung der Extraktion von aufgeschlossenen Milcheiweiß aus erhitzten Fleischerzeugnissen für den serologischen Nachweis.
Diss. med. vet. München 1973
78. Putnam, F.W.: Protein denaturation.
In: Neurath-Bailey: Proteins. Bd. I B,
Academic Press, New York-London 1963, S. 809
79. Raymond, S. und M. Nakamichi: Electrophoresis in synthetic gels.
I. Relation of gel structure to resolution.
Anal. Biochem. 3 (1962), 23
80. Raymond, S. und L. Weintraub: Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis.
Science 130 (1959), 711
81. Renner, E.: In: Milch und Milchprodukte in der Ernährung des Menschen.
Arbeitsgemeinschaft für das Milchwirtschaftliche Fachbuch.
Volkswirtschaftl. Verlag, Kempten
Verlag Th. Mann, Hildesheim 1974, S. 81
82. Richards, E.G., J.A. Coll und W.B. Gratzner: Disc electrophoresis of ribonucleic acid in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 12 (1965), 452
83. Foulet, D.L.A., M. Bein und G. von Muralt: Immunelektrophoretische Untersuchungen an Kuhmilchpräparaten.
Milchwiss. 16 (1961), 415

84. Rout, T.P.: An electrophoretic method for the detection of milk solids in foodstuffs.
Austr. J. Dairy Technol. 26 (1971), 26
85. Scheidegger, J.: Une microméthode de l'immuno-électrophorèse.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 7 (1955), 103
86. Schmidt, H.: Fortschritte der Serologie. 2. Aufl.
Verlag Steinkopff, Darmstadt 1955, S. 364 und 744
87. Schulte, K.E. und F. Müller: Elektrophoretische Studien an Milchproteinen. I. Mitt.
Milchwiss. 10 (1955), 90
88. Schulte, K.E. und F. Müller: Elektrophoretische Studien an Milchproteinen. V. Mitt.
Milchwiss. 10 (1955), 270
89. Sinell, H.J.: Probleme bei der Spezies-Identifizierung von Proteinen in Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 121
- 89 a. Sinell, H.J.: Verarbeitung von Hühnersiweiß in Brühwurst.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 75 (1962), 48
90. Sinell, H.J. und R. Kluge-Wilm: Immunelektrophoretischer Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in erhitzten Fleischerzeugnissen und Versuche zu einer quantitativen Auswertung.
Zbl. Vet. Med. B 15 (1968), 802
91. Sinell, H.J. und J. Mantz: Mikrotiter-Hämagglutinationshemmung zum Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen.
Wien. tierärztl. Wschr. 60 (1973), 79

92. Smithies, O.: Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults.
Biochem. J. 61 (1955), 629
93. Smithies, O.: Zone electrophoresis in starch gels and its application to studies of serum proteins.
Advanc. Protein Chem. 14 (1959), 65
94. Smithies, O.: Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1 (1962), 125
zit. nach: Maurer, H.R. (64)
95. Spell, E.: Nachweis von Milcheiweiß und Sojaseiweiß in Fleischerzeugnissen mit Hilfe der vertikalen Flachdisk-Elektrophorese.
Fleischwirtschaft 52 (1972), 1451
96. Stadelmann, W.: Nachweis und quantitative Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensmitt.-Untersuch. 117 (1962), 24
97. Thalacker, R.: Die Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen.
Dt. Lebensmittel-Rdsch. 59 (1963), 111
98. Thompson, M.P. et al.: Nomenclature of the proteins of cow's milk - second revision.
J. Dairy Sci. 48 (1965), 159
99. Tongur, W.S.: Einige Fragen zur Umkehrbarkeit der Eiweißdenaturierung.
In: Zur Biochemie des Eiweißes.
Sammlung sowjetischer Arbeiten.
VEB Dt. Verlag der Wissenschaften, Berlin 1956, S. 38
100. Wadsworth, C. und L.^A Hanson: Comparative analysis of immune electrophoretic precipitates employing a modified immune electrophoretic technique.
Int. Arch. Allergy 17 (1960), 165

101. Warner, R.C.: Separation of α - and β -casein.
J. Am. Chem. Soc. 66 (1944), 1725
102. Waugh, D.F. und P.H. von Hippel: κ -casein and the stabilization of casein-micelles.
J. Am. Chem. Soc. 78 (1956), 4576
103. Wyler, O.: Soja-Eiweiß-Nachweis in Fleischwaren und anderen Lebensmitteln.
Mitt. Gebiets Lebensm. Hyg. 59 (1968), 401
104. Wyler, O. und J.-J. Siegrist: Einfache, empfindliche Nachweismethode für fleischfremde, tierische Eiweißarten.
Mitt. Gebiets Lebensm. Hyg. 56 (1965), 299
105. Zwetkova, Z.: Nachweis von Natrium-Caseinat in Fleischerzeugnissen.
Fleischwirtschaft 48 (1968), 1486
106. Peterson, R.F.: High resolution of milk proteins obtained by gel electrophoresis.
J. Dairy Sci. 46 (1963), 1136.

Abschließend möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. h.c. L. Kotter für die Überlassung des Themas herzlich danken.

Herrn OFVet. Dr. P. Maurus gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Herzlich danke ich auch Herrn OstVet. Dr. P. Weigert für die technische Hilfe.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Fräulein Dr. Ch. Herrmann für die gern gewährte Unterstützung, die wertvollen Anregungen und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Lebenslauf

Am 13. August 1945 wurde ich als Sohn des Lehrers Paul Gerhard Feist und seiner Ehefrau, der Ärztin Ursula Feist, geborene Krawutschke, in Elsendorf, Kreis Mainburg/Niederbayern, geboren.

Von 1951 bis 1955 besuchte ich die evangelische Volksschule in Eichstätt/Bayern, anschließend bis zur Reifeprüfung 1965 das Humanistische Gymnasium. Im Schuljahr 1958/59 ging ich als Internats-schüler in das Humanistische Gymnasium in Windsbach/Mittelfranken.

Von Oktober 1965 bis September 1967 leistete ich den Wehrdienst ab.

Vom Wintersemester 1967/68 bis zum Bestehen der Tierärztlichen Prüfung im Mai 1973 studierte ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Im August 1973 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

Nach einem halben Jahr Tätigkeit in der tierärztlichen Praxis begann ich im Oktober 1973 mit der Dissertationsarbeit, für die ich seit Januar 1974 ein Stipendium nach dem Graduierten-Förderungsgesetz erhalte.

